



**Universidad Nacional  
Autónoma de México**

---

---

Facultad de Química

**“Mejoramiento de las  
condiciones de cultivo  
sumergido para  
*Sinorhizobium meliloti* en  
matraces agitados”**

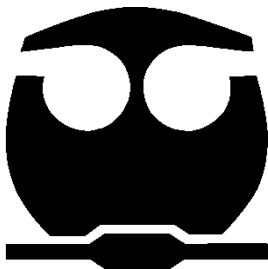
**T E S I S**

Para obtener el título de

**Químico de Alimentos**

Presenta

**Christian Rico Junco**



México D.F.

2012

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Rodolfo Pastelin Palacios

VOCAL

Maricarmen Quirasco Baruch

SECRETARIO

Mauricio Alberto Trujillo Roldán

PRIMER SUPLENTE

Martha Giles Gómez

SEGUNDO SUPLENTE

Beatriz Ruiz Villafán

El presente proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México en asociación con la empresa Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V.

Asesor del tema:

---

Sustentante:

---

*El presente proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en asociación con la empresa Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V. La dirección corrió a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán, contando con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 82533 y 103393) y del Programa de Apoyo Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN228509).*

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo y acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco al Dr. Mauricio Trujillo Roldán por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. A todas las demás personas involucradas en lo académico por los consejos, el apoyo y el ánimo que me brindaron, por su paciencia ante mi inconsistencia, y por la atenta lectura de este trabajo y, por último pero no menos importante, por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis y sus atinadas correcciones.

Gracias también a mis queridos compañeros y amigos de trabajo de la Unidad de Bioprocesos, de la Facultad de Química y de todo el Instituto en general, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante mi estancia en la Unidad; de convivir dentro y fuera del trabajo y de las responsabilidades. Luis, Blanca, Miki, Aurea, Jesús, Ram, Lalo y Leslie, gracias.

A mi familia que me acompañaron en esta aventura que significó la licenciatura y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. A ti Andy, que desde un principio hasta el día hoy sigues dándome ánimo para terminar este proceso y todos los obstáculos que se me presentan.

Gracias a todos.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
2.1 Importancia de la fijación biológica del nitrógeno	5
2.2 Implicaciones medioambientales	6
2.3 Organismos fijadores de nitrógeno	8
2.3.1 Asociaciones simbióticas	8
2.3.2 Simbiosis asociativas	9
2.3.3 Bacterias de vida libre	9
2.4 La Nitrogenasa	10
2.4.1 Nomenclatura	10
2.5 Simbiosis leguminosa-rizobio	11
2.5.1 Las leguminosas	11
2.5.2 Los rizobios	11
2.5.2.1 <i>Rhizobium sp.</i>	12
2.5.2.1.1 Descripción microscópica y macroscópica	12
2.5.2.1.2 Metabolismo	13
2.5.2.1.3 Genética	14
2.5.3 Simbiosis	15
2.6 Inoculantes rizobianos	17
2.6.1 Calidad en inoculantes rizobianos	18
2.7 Medios de cultivo	19
2.7.1 Clasificación de los medios de cultivo según su composición	19
2.8 Nutrición microbiana	19
2.8.1 Macronutrientes	20
2.8.2 Oxígeno	21

<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
3.1 Objetivo general	22
3.2 Objetivos particulares	22
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
4.1 Cuadro metodológico	23
4.2 Identificación de las cepas	24
4.2.1 Caracterización de las colonias en medio sólido	24
4.2.2 Tinción de Gram	24
4.3 Diseño de los medios de cultivo	25
4.4 Cinética control y selección de cepas	26
4.5 Cinéticas de crecimiento	26
4.6 Pruebas de viabilidad (cuenta en placa)	27
4.7 Curva estándar de peso seco	28
4.8 Banco de Trabajo	30
4.9 Cultivo de <i>S. meliloti</i> C y D en biorreactores de 12 L	30
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
5.1 Caracterización y pureza de las cepas	32
5.2 Cinética Control (banco original)	35
5.3 Variación fuente de carbono cepas A y B (banco original)	40
5.4 Generación de un nuevo banco de trabajo	43
5.5 Variación fuente de carbono cepas C y D (banco nuevo)	45
5.6 Variación relación C/N cepas C y D (banco nuevo)	49
5.6.1 Manitol	49
5.6.2 Sacarosa	52
5.6.3 Glucosa	54
5.6.4 Fructosa	57
5.7 Comparación de las condiciones de mayor crecimiento para las cepas C y D	59
5.8 Fermentación <i>S.meliloti</i> C y D en biorreactores de 12 L.	61
5.9 PHB (Polihidroxibutirato)	64
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>67</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>68</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo del nitrógeno. Tomado de Sawyer y McCarty	5
<b>Figura 2</b>	Dinámica de formación de un nódulo en la raíz en una leguminosa causada por <i>Rhizobium sp.</i> Tomado de Vanderleyden y Pieterneel	16
<b>Figura 3</b>	Curva estándar peso seco ensayo cepa A	28
<b>Figura 4</b>	Morfología macroscópica y microscópica <i>S. meliloti</i> A	33
<b>Figura 5</b>	Morfología macroscópica y microscópica <i>S. meliloti</i> B	33
<b>Figura 6</b>	Morfología macroscópica y microscópica <i>S. meliloti</i> C	34
<b>Figura 7</b>	Morfología macroscópica y microscópica <i>S. meliloti</i> D	34
<b>Figura 8</b>	Comparación cinética control (banco original) de las 4 cepas de <i>S. meliloti</i>	36
<b>Figura 9</b>	Comparación cinética de caja de <i>S. meliloti</i> A y B (Banco Original)	37
<b>Figura 10</b>	Comparación cinética de la variación de la fuente de carbono para la cepa A (Banco Original)	40
<b>Figura 11</b>	Comparación cinética de la variación de la fuente de carbono para la cepa A (Banco Original)	41
<b>Figura 12</b>	Comparación cinética control (Banco Nuevo) de las cuatro cepas de <i>S. meliloti</i>	44
<b>Figura 13</b>	Vía de Entner-Doudoroff y vías alternas para la formación de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato en <i>E. coli</i> . Tomado de García y Ponce	46
<b>Figura 14</b>	Comparación cinética de la variación de la fuente de carbono para la cepa C (Banco Nuevo)	47
<b>Figura 15</b>	Comparación cinética de la variación de la fuente de carbono para la cepa D (Banco Nuevo)	48

<b>Figura 16</b>	Variación de la relación C/N con manitol como fuente de carbono para la cepa C	51
<b>Figura 17</b>	Variación de la relación C/N con manitol como fuente de carbono para la cepa D	51
<b>Figura 18</b>	Variación de la relación C/N con sacarosa como fuente de carbono para la cepa C	53
<b>Figura 19</b>	Variación de la relación C/N con sacarosa como fuente de carbono para la cepa D	54
<b>Figura 20</b>	Variación de la relación C/N con glucosa como fuente de carbono para la cepa C	56
<b>Figura 21</b>	Variación de la relación C/N con glucosa como fuente de carbono para la cepa D	56
<b>Figura 22</b>	Variación de la relación C/N con fructosa como fuente de carbono para la cepa C	58
<b>Figura 23</b>	Variación de la relación C/N con fructosa como fuente de carbono para la cepa D	58
<b>Figura 24</b>	Comparación de las mejores relaciones C/N con respecto a las fuentes de carbono utilizadas para la cepa C	59
<b>Figura 25</b>	Comparación de las mejores relaciones C/N con respecto a las fuentes de carbono utilizadas para la cepa D	60
<b>Figura 26</b>	Cinética de crecimiento de <i>S. meliloti</i> C y D en reactor de 12 L	61
<b>Figura 27</b>	Parámetros fisicoquímicos obtenidos del controlador durante el cultivo en biorreactor de <i>S. meliloti</i> C y D	62



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Comparación del medio de cultivo original con respecto a los medios diseñados	25
<b>Tabla 2</b>	Composición del medio PY	27
<b>Tabla 3</b>	Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad entre las cepas de <i>S. meliloti</i>	36
<b>Tabla 4</b>	Comparación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y densidad óptica (600 nm) para las cepas A, B, C y D de <i>S. meliloti</i> de cultivos en caja y banco.	38
<b>Tabla 5</b>	Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de la cepa A variando la fuente de carbono (Banco Original)	41
<b>Tabla 6</b>	Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de la cepa B variando la fuente de carbono (Banco Original)	42
<b>Tabla 7</b>	Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad entre las cepas de <i>S. meliloti</i> (Banco Nuevo)	44
<b>Tabla 8</b>	Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de la cepa C variando la fuente de carbono (Banco Nuevo)	47
<b>Tabla 9</b>	Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de la cepa D variando la fuente de carbono (Banco Nuevo)	48
<b>Tabla 10</b>	Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de las relaciones C/N más eficientes para la cepa C	59
<b>Tabla 11</b>	Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de las relaciones C/N más eficientes para la cepa C	60

## RESUMEN

El sistema de agricultura moderna, hasta el momento, es completamente dependiente del suministro de fertilizantes químicos, a pesar de que éstos son cada vez más escasos y costosos. Los fertilizantes químicos son considerados uno de los principales agentes contaminantes tanto del agua como del aire. Esta situación alarmante, ha llevado a la identificación y producción de insumos inocuos y amigables con el medio ambiente como lo son los biofertilizantes, es decir, inóculos microbianos en los cultivos, que no sólo aumentan la asimilación de nutrientes esenciales para la planta, como lo son el nitrógeno, fósforo y potasio, sino que también mejoran las propiedades del suelo, aumentando el contenido de materia orgánica y el de nitrógeno total disponible en el suelo.

Para poder mejorar las condiciones del suelo, es importante incorporar microorganismos eficientes en la rizosfera; es por eso que el hábitat también desempeña un papel importante en la formación de las comunidades microbianas. Los microorganismos que pueden ser utilizados como biofertilizante incluyen a distintas bacterias, como lo son *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azospirillum*, así como algunos hongos y algas.

*Rhizobium* es el más estudiado y de los géneros más importantes en lo que respecta a las bacterias fijadoras de nitrógeno. Éste es capaz de fijar nitrógeno atmosférico mediante una relación de simbiosis con algunas especies de leguminosas. Para cada bacteria el modo de acción así como su planta hospedera es diferente, que para el caso específico de *Sinorhizobium meliloti*, fertiliza a las leguminosas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*, tal es el caso de la alfalfa, trébol de olor y fenogreco respectivamente.

La utilidad de los biofertilizantes se puede incrementar mediante una selección de cepas eficientes, así como el buen cultivo de éstos; es por eso que el estudio de estos microorganismos, así como el uso de la biotecnología agrícola, es de vital importancia para el mejoramiento de la agricultura.

En este trabajo se usaron 4 cepas de *S. meliloti* denominadas como A, B, C y D respectivamente, proporcionadas por la empresa Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V. Inicialmente, se hizo una caracterización macroscópica de parámetros como tipo y forma de colonias, tamaño y color; y microscópica como forma y Gram. Posteriormente se realizaron cinéticas de crecimiento y ensayos de viabilidad con medios de cultivo proporcionados por la empresa con la finalidad de optimizar las condiciones nutrimentales del medio de cultivo para la obtención del inoculante. Este es el producto final de la fermentación, es decir el microorganismo en sí o la biomasa generada. Para esto se hicieron variaciones de la fuente de carbono así como en las concentraciones de éstas en función de la relación C/N de los medios utilizados: YEM (manitol), YES (sacarosa), YEG (glucosa) y YEF (fructosa). Se utilizaron entonces fuentes de carbono como manitol (control), sacarosa, glucosa y fructosa a concentraciones por arriba (C/N 100) y por abajo (C/N 50) con respecto a la concentración control de C/N 73. Se tomó en cuenta también para el análisis de resultados el aspecto de la viabilidad mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Finalmente, con base en los resultados obtenidos se comparó la productividad o rendimiento celular del medio de cultivo optimizado con respecto al medio proporcionado por la empresa, encontrándose que el mejor medio de cultivo fue aquel con la formulación inicial, con manitol como fuente de carbono a una C/N de 73, obteniéndose un valor máximo de D.O. de 1.5 u.a, comparado con las demás relaciones C/N y fuentes de carbono como sacarosa, glucosa y fructosa en donde los valores de D.O. registrados estuvieron por debajo de 1.0 u.a.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los suelos, uno de los elementos más escaso para el desarrollo vegetal es el nitrógeno (Franco y Dobereiner, 1994), para solucionar esta problemática los productores del sector agropecuario utilizan indiscriminadamente fertilizantes químicos con el objetivo de mejorar la calidad de los cultivos o del forraje (Marín *et al.*, 2003). Sin embargo, este método es costoso y poco amigable con el medio ambiente, ocasionando así desastres como la contaminación de aguas subterráneas, erosión de los suelos, cambios de la composición fisicoquímica del suelo, además de una notable destrucción de la biota y microbiota del suelo (Justic *et al.*, 1995; Rabalais *et al.*, 1996).

Dentro del concepto de agricultura sustentable, existen tecnologías limpias como lo es la biofertilización con bacterias fijadoras de nitrógeno. Esta actividad parece ser una alternativa segura, efectiva y económica para recuperar la calidad y productividad de los suelos. Se ha demostrado que estos mismos microorganismos fijadores de nitrógeno pueden realizar otro tipo de funciones o beneficios como la solubilización del fósforo o la producción de fitohormonas, que también contribuyen para la recuperación y rendimiento de los suelos (Mahecha, 2002; Sylvia *et al.*, 2005).

Los biofertilizantes se clasifican en dos grupos: de acción directa e indirecta. Los primeros agrupan microorganismos que habitan en algún componente de los tejidos vegetales, y por ello la acción benéfica se realiza en la planta y no en su medio circundante, es el caso de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y las micorrizas. En tanto, en la acción indirecta la biofertilización es aprovechada primero por el suelo y lo transmite hacia los cultivos, pertenecen a este grupo los mecanismos de acción que trabajan en la solubilización de nutrientes como el fósforo (González, 2010).

La acción de introducir hongos y/o bacterias a la semilla, al suelo o a los sistemas de riego en cultivos de leguminosas, gramíneas, hortalizas y frutales, se le conoce como inoculación. Generalmente, los beneficios se traducen en mayor desarrollo de la raíz y rendimiento en el grano. Los resultados a través del tiempo son suelos más ricos en contenido de materia orgánica y nutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, entre otros). (Tejada *et al.*, 2005).

El éxito en el proceso de inoculación depende de factores como la incidencia de luz, la temperatura, el tipo de suelo, las regiones climáticas, la mezcla con biofertilizantes y agroquímicos, la caducidad de los productos, entre otros. Estos aspectos requieren de un proceso de capacitación y acompañamiento por lo que varias dependencias gubernamentales y empresas particulares dedicadas a la producción de biofertilizantes ayudan a entender cómo usar la tecnología para lograr los mejores beneficios (González, 2010).

En este trabajo, se presenta la optimización del medio de cultivo de las cepas de *S. meliloti* mediante el estudio del comportamiento cinético con la finalidad de obtener un inoculante (biomasa) para su uso como biofertilizante.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Importancia de la fijación biológica del nitrógeno

El nitrógeno es el elemento más limitante para el crecimiento de la planta y por ende para la productividad agraria (Vance, 1998; Bohlool *et al*, 1992). La fijación biológica del nitrógeno y la aplicación de fertilizantes representan las principales fuentes de este elemento para los cultivos en general y las leguminosas en particular (Sprent, 2001). Este proceso es fundamental en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, ya que permite reducir el nitrógeno atmosférico por un conjunto de organismos procariontes conocidos como diazotrofos. Debido a la naturaleza inerte del nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ), su reducción es energéticamente muy costosa, por esta razón, la mayoría de las este tipo de bacterias han desarrollado asociaciones simbióticas con plantas de las que obtienen la energía necesaria para llevar a cabo la fijación de nitrógeno (Lum y Hirsh, 2003).

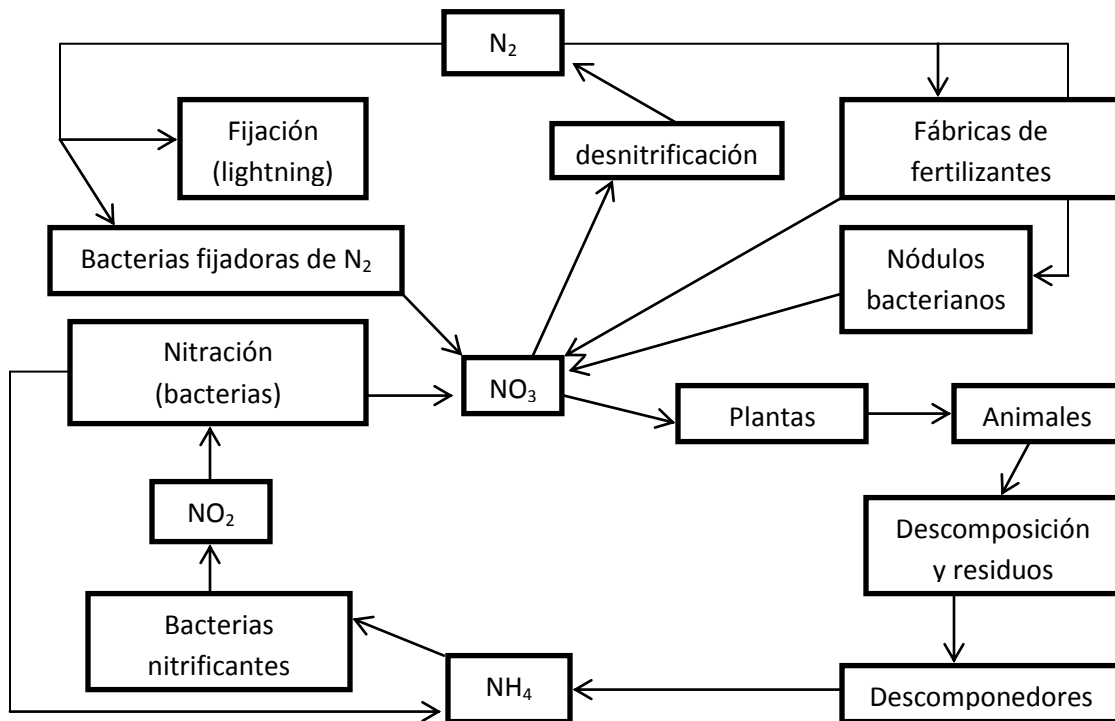


Figura 1. Ciclo del Nitrógeno. Tomado de Sawyer y McCarty (1978).

En la agricultura, una parte importante de la fijación biológica del nitrógeno está relacionada a las especies de leguminosas que establecen asociaciones con bacterias que en conjunto se les conoce como rizobios. Se calcula que anualmente se fijan entre 40 y 48 millones de toneladas de nitrógeno por las leguminosas cultivadas (Jenkinson, 2001), lo que equivale a un ahorro de hasta 10 billones de dólares en fertilizantes (Graham y Vance, 2003). Además, de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, existen otro tipo de asociaciones entre organismos fijadores de nitrógeno y plantas, como es el caso de las cianobacterias del género *Anabaena* y helechos del género *Azolla*, que se emplean como fuente de nitrógeno atmosférico en cultivos de arroz (Jensen y Huaggaard-Nielsen, 2003). También las bacterias del género *Frankia* establecen simbiosis poco específicas con plantas leñosas no leguminosas, denominadas actinorrizas, que desarrollan nódulos en las raíces quedando el simbionte confinado en el córtex nodular (Leary *et al.*, 2006) y los endófitos diazotrofos que se han aislado de gramíneas entre los que se encuentran especies de los géneros *Gluconoacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, y *Burkholderia*, siendo *G. diazotrophicus* utilizada como modelo de bacteria endófito fijadora de nitrógeno debido a su hábitat endófito obligado (Tejera *et al.*, 2006).

## **2.2 Implicaciones medioambientales**

La producción industrial de amonio a partir del N<sub>2</sub> atmosférico mediante el proceso de Haber-Bosch y su utilización como fertilizante, permitió la llamada revolución verde, que produjo un notable incremento en la productividad de cereales en diversos países (Vance, 1998). Sin embargo, la aplicación de fertilizantes de origen industrial tiene elevados costos ambientales, ya que en primer lugar se requieren 1.5 kg de combustible fósil por cada kg de fertilizante producido con la consiguiente producción de CO<sub>2</sub> y su contribución al efecto invernadero (Jensen y Hauggaard-Nielsen, 2003).

En segundo término, este problema se correlaciona con el aumento de los niveles de óxido nitroso ( $N_2O$ ) en la troposfera (Ledley *et al.*, 1999), sin olvidar que este gas tiene una elevada potencialidad para contribuir también al efecto invernadero y a la disminución de la capa de ozono. Además, se presenta otro efecto negativo que está relacionado con las pérdidas del nitrato por lixiviación, que son significativas y conducen a la contaminación de las aguas subterráneas (Jenkinson, 2001).

El proceso natural de la fijación biológica de nitrógeno, tiene un papel crucial para evitar los problemas derivados del uso de fertilizantes de origen industrial y permitir el desarrollo de sistemas agrícolas sustentables. Según Vance y Graham (1995) el incremento en el uso de la fertilización biológica del nitrógeno en la agricultura contribuiría a reducir hasta en un 50% la producción de fertilizantes, con la consiguiente reducción de la emisión de  $CO_2$ ; se evitaría la contaminación de las aguas debido a que el nitrógeno fijado biológicamente, es directamente asimilado por la planta y también habría una disminución en la dependencia de los cultivos del uso de fertilizantes con el consiguiente ahorro en los costos de producción agrícola.

Por tanto, se impone la fijación biológica del nitrógeno para el desarrollo de sistemas agrícolas respetuosos con el medio ambiente, capaz de cubrir la demanda de alimentos de una población en aumento (Becker *et al.*, 1995)



## **2.3 Organismos fijadores de nitrógeno**

La habilidad para fijar nitrógeno es ampliamente usada entre varios géneros bacterianos; y es por esta razón que existe una gran variedad metabólica entre los microorganismos que tienen esta capacidad. Se distinguen tres formas mediante las cuales los microorganismos pueden llevar a cabo la FBN: por medio de asociaciones simbióticas, simbiosis asociativas y bacterias de vida libre (Newton y Fisher, 2002).

### *2.3.1 Asociaciones simbióticas*

Para la agricultura, la relación simbiótica más importante incluye a las bacterias denominadas rizobios con plantas leguminosas. Esta asociación, maximiza la transferencia de nitrógeno fijado a la planta a partir de los rizobios residentes en su interior, los cuales están presentes en una estructura denominada “nódulo”, en las raíces de la planta. La planta de forma recíproca provee de protección y sule de compuestos ricos energéticamente a la bacteria. Los nódulos también proveen un ambiente con bajo contenido de oxígeno, lo cual es vital, ya que la nitrogenasa, enzima que cataliza la FBN, es desnaturalizada por el oxígeno (O<sub>2</sub>). Sin embargo, bajas concentraciones de oxígeno deben ser provistas a la bacteria para que esta pueda respirar y producir la energía requerida tanto para su supervivencia como para conducir la FBN. Una proteína especial que se encuentra en la planta misma, transportadora de oxígeno denominada leghemoglobina, regula la cantidad de oxígeno que llega a la bacteria. Esta proteína es de altísima afinidad, puesto que por cada 1000 leghemoglobinas ligadas a oxígeno sólo se encuentra una molécula de oxígeno libre (Madigan *et al.*, 2002).

### 2.3.2 Simbiosis asociativas

Desafortunadamente, la relación simbiótica basada en nódulos que consiste en la cooperación metabólica tanto de la planta como de la bacteria para el intercambio de nutrientes, no se extiende a la mayoría de los cultivos alimenticios importantes como el maíz, arroz, trigo y de tubérculos, ninguno de los cuales tiene una pareja para fijar nitrógeno. Sin embargo, otras asociaciones, menos formales, llamadas simbiosis asociativas son comunes entre ciertas gramíneas y bacterias. Por ejemplo, las gramíneas tropicales, *Paspalum* y *Digitaria* se asocian con las bacterias *Azotobacter paspali* y *Azospirillum brasilense* respectivamente. Con *Paspalum*, la bacteria fijadora de nitrógeno vive afuera del tejido de la planta en una vaina mucilaginosa alrededor de la raíz. La asociación *Digitaria-Azospirillum* envuelve la invasión de la raíz pero no los nódulos. Una asociación formal es la que ejercen *Gluconobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum* sp. con la caña de azúcar, quienes satisfacen completamente los requerimientos de nitrógeno fijado para el crecimiento de las plantas. De forma similar, la asociación *Azoarcus* spp. con la gramínea *Kallar* y posiblemente con arroz también indican una significancia agronómica y un potencial económico (Newton y Fisher, 2002).

### 2.3.3 Bacterias de vida libre

La mayoría de las bacterias que fijan nitrógeno no están asociadas con las plantas. Ellas viven libres en el suelo y fijan nitrógeno para su propio beneficio y requerimientos metabólicos, y durante su desarrollo o en el momento de su muerte, este nitrógeno puede ser aprovechado por las plantas. (Newton y Fisher, 2002).

Las bacterias más ampliamente estudiadas de vida libre son *Azotobacter vinelandii* (aerobio obligado), *Klebsiella pneumoniae* (anaerobio facultativo), *Clostridium pasteurianum* (anaerobio obligado), *Rhodobacter capsulatus* (bacteria fotosintética) y varias especies de *Anabaena* y *Nostoc* (cianobacterias formadoras de heteroquistes). La FBN que hacen estos organismos llega a ser generalmente disponible para el ecosistema circundante cuando la bacteria muere (Newton y Fisher, 2002).

## **2.4 La nitrogenasa**

La actividad nitrogenasa es central para el mantenimiento del ciclo del nitrógeno en la tierra. En un planeta con una atmósfera llena de  $N_2$  (aproximadamente 78%) es de esperarse que este elemento se encuentre disponible para el metabolismo de los seres vivos, sin embargo, el nitrógeno fijado frecuentemente es el elemento limitante para el crecimiento de microorganismos, plantas y animales. Los fijadores de nitrógeno están en dependencia de su capacidad para producir ATP o de la fotosíntesis de las plantas verdes para obtener la gran cantidad de energía que es requerida para reducir el nitrógeno molecular. (Burriss, 1991).

### *2.4.1 Nomenclatura*

La nitrogenasa es un sistema enzimático constituido por 2 proteínas diferentes. La dinitrogenasa (también referida como MoFe o proteína I), es una proteína que tiene por función unir y reducir el nitrógeno ( $N_2$ ) u otros substratos; y la dinitrogenasa reductasa (también referida como proteína Fe o proteína II) y tiene el rol específico de pasar electrones, uno a la vez a la dinitrogenasa. (Burriss, 1991).

## 2.5 Simbiosis leguminosa-rizobio

### 2.5.1 Las Leguminosas

La habilidad para establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con rizobios es estricta de las leguminosas, con una excepción, el género *Parasponia* de Ulmaceae. La familia Leguminosae, comprende tres subfamilias como Caesalpinioideae, Mimosoideae, y Papilionoideae, cada una de las cuales contiene géneros aptos para formar nódulos en las raíces. En estas 3 subfamilias, el porcentaje de especies noduladas son diferentes. (Cook *et al.*, 2005).

Las plantas leguminosas son muy diversas en morfología, hábitat y ecología, cambiando de anuales árticas a árboles tropicales. Debido al gran número de leguminosas que son noduladas por rizobios, la simbiosis con rizobios no es aparentemente una adaptación a un nicho ecológico especializado, sino que depende a alguna peculiaridad genética de las leguminosas, una que es tan compleja que no se tiene reportado hasta la fecha otra planta involucrada del reino (Cook *et al.*, 2005).

### 2.5.2 Los rizobios

Con base en las secuencias de genes de 16S rRNA, todos los rizobios son miembros del phylum Proteobacteria, pero en diferentes clases y ordenes (Wang y Romero, 2004). La mayor parte de los rizobios son del orden VI, Rhizobiales, de la clase I,  $\alpha$ -proteobacteria (Wang y Romero, 2004). En este orden, los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* se incluyen en la familia Rhizobiaceae. *Mesorhizobium* está en la familia Phylobacteriaceae. *Bradyrhizobium* y *Blastobacter* están en la familia Bradyrhizobiaceae. *Azorhizobium* y *Devosia* se incluyen en la familia Hyphomicrobiaceae. En el mismo orden, también se encuentran bacterias formadoras de nódulos en *Methylobacterium* de la familia Methylobacteriaceae (Wang y Romero, 2004).

Sólo 2 grupos bacterianos en la case II,  $\beta$ -proteobacteria, incluyen bacterias que forman nódulos con las leguminosas. Ellas son *Burkholderia* spp. y *Ralstonia taiwanensis* en el orden Burkholderiales (Wang y Romero, 2004).

Aunque estas bacterias tienen muy diversas relaciones filogenéticas al comparar a los genes 16S rRNA, se encuentra una gran similitud entre las secuencias de sus genes simbióticos, como *nif* y *nod*, indicando que transferencias horizontales de los genes simbióticos, ocurrieron en la naturaleza entre ellas, como se ha descrito en especies de *Mesorhizobium* (Wang y Romero, 2004). Este evento es importante para la evolución de los rizobios, porque cada género tiene vecinos no simbióticos que tienen el potencial de recibir los genes simbióticos desde los rizobios. Todos estos datos indican que los rizobios y sus vecinos filogenéticos tenían orígenes comunes. Se puede suponer que nuevos linajes de rizobios sigan emergiendo todavía en la naturaleza debido a la transferencia de los genes simbióticos y al hecho de que bacterias no simbióticas, relacionadas con rizobios, pueden convertirse en bacterias formadoras de nódulos eficientes tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Wang y Romero, 2004).

#### 2.5.2.1 *Rhizobium* sp

##### 2.5.2.1.1 Descripción microscópica y macroscópica

Bacilos de 0.5-1.0 X 1.2-3.0  $\mu\text{m}$ . No esporoformados. Gram negativo. Móvil por flagelos peritricos. Las fimbrias, que son pelos cortos que utilizan las bacterias para adherirse a las superficies y en algunas ocasiones para transferencia de material genético han sido descritas en algunas cepas. La colonias son generalmente blancas o beige, circulares convexas, semitraslúcidas u opacas, a veces mucoides, usualmente de 2 a 4 mm de diámetro con incubación de 3-5 días en medio LMA (levadura-manitol-sales-agar) (Kuykendall *et al.*, 2005).

El crecimiento en un medio de carbohidratos es usualmente acompañado por abundante cantidad de exopolisacáridos extracelulares, y la turbidez por crecimiento se desarrolla de 2 a 3 días en caldo aireado o agitado en matraces convencionales (Kuykendall *et al.*, 2005).

#### 2.5.2.1.2 Metabolismo

Aerobios, poseen un metabolismo respiratorio con oxígeno como aceptor terminal de electrones. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30° C; algunas especies pueden crecer a temperaturas de hasta 40° C. El pH óptimo de crecimiento está entre 6.0 y 7.0. Sin embargo, pueden llegar a crecer en entre valores de 4.0 a 10.0. El tiempo de generación de las cepas de *Rhizobium* está entre 1.5-5.0 horas (Kuykendall *et al.*, 2005).

*Rhizobium sp.* y *Sinorhizobium sp.* son quimiorganoheterótrofos, utilizan un amplio intervalo de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono, sin formación de CO<sub>2</sub>. No son capaces de metabolizar la celulosa y el almidón. Las sales de amonio, de nitrato y la mayoría de los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno. Algunas cepas requieren factores de crecimiento como biotina, pantotenato, o ácido nicotínico. La peptona es pobremente utilizada mientras que la caseína, el almidón, la quitina y el agar no son hidrolizadas (Kuykendall *et al.*, 2005).

Los principales mecanismos para el catabolismo de la glucosa son la vía de Entner-Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato. Es poco probable que la vía de Embden-Meyerhof-Parnas opere en *Rhizobium sp.*, debido a que la actividad de las enzimas fructosa-1,6 difosfato aldolasa y 6 fosfofructoquinasa son bajas (Kuykendall *et al.*, 2005).

### 2.5.2.1.3 Genética

El primer mapa del genoma de *R. leguminosarum* fue construido por Beringer y Hopwood en 1976. El genoma de *Sinorhizobium meliloti* también ha sido estudiado (Kuykendall *et al.*, 2005), donde estas 2 especies tienen un arreglo similar en su cromosoma. *S. meliloti* tiene un cromosoma de  $3.7 \times 10^6$  pb y su secuencia ya ha sido reportada (Kuykendall *et al.*, 2005).

Algunos miembros del Rhizobiaceae y Phyllobacteriaceae se caracterizan por su habilidad de incorporar elementos génicos funcionales como plásmidos o islas simbióticas las cuales permiten establecer una relación de tipo patógena, o simbiótica para fijar nitrógeno en las plantas.

Las células de *Rhizobium sp.* contienen hasta 10 plásmidos que van en tamaño desde 100 kb hasta más de 1000 kb. En algunas ocasiones, la longitud aproximada de la combinación de plásmidos y megaplásmidos puede significar más del 50% del genoma de *Rhizobium sp.* Tanto los genes *nod* como los *nif*, implicados en simbiosis y fijación del nitrógeno respectivamente, han sido siempre hallados juntos en uno o más plásmidos de *Rhizobium sp.* llamados pSym. Los genes que controlan la nodulación están regulados en varios operones regulados coordinadamente. Por ejemplo, el operón *nodABC* está presente en todas las cepas simbióticas con leguminosas y puede complementar cepas en diferentes géneros. Para *R. etli* *nodA* está separado de *nodBC*, y para *Mesorhizobium loti*, *nodB* es independiente de *nodAC* (Kuykendall *et al.*, 2005).

Otros podrían presentar en diferentes especies como variantes alélicas, tales como *nodEF*, y estos son específicos del hospedero y por ello no son intercambiables. Los plásmidos pSym no son esenciales para la supervivencia de las cepas de *Rhizobium* en el suelo. Las bacterias del suelo no nodulantes identificadas como especies de *Rhizobium* han sido aisladas y pueden llegar a formar nódulos después de una transconjugación con especies simbióticas relacionadas.

La transferencia de plásmidos simbióticos entre especies de *Rhizobium* ha sido reportada bajo condiciones de laboratorio y ha sido demostrado por comparación de secuencias de aislamientos naturales (Kuykendall *et al.*, 2005).

### 2.5.3 Simbiosis

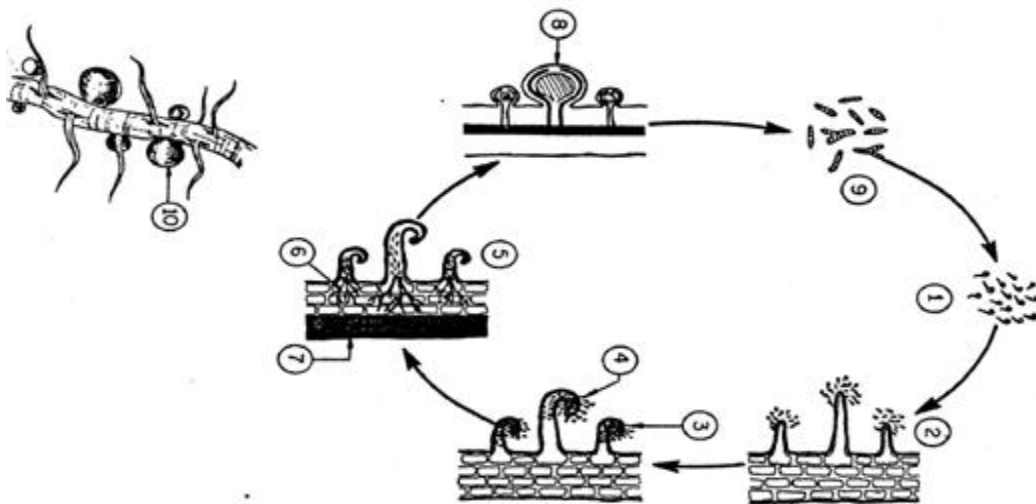
Con el objeto de iniciar una simbiosis efectiva, los rizobios deben reconocer y responder a la presencia de la raíz de la planta hospedera. Durante el crecimiento en la rizósfera de una planta hospedera, los rizobios detectan compuestos tales como flavonoides y betaínas que son secretados por la raíz hospedera para la inducción de los genes *nod*. Los genes *nod* codifican para más de 25 proteínas requeridas para la síntesis bacteriana y la exportación de los factores Nod. Los factores Nod son señales de lipooligosacáridos que consisten de una columna de quitina que tiene de 4 a 5 unidades de N-acetilglucosamina de largo, con un lípido atado al extremo no reductor y modificaciones específicas al hospedero en su principal estructura (Gage, 2004).

Otras respuestas de los rizobios cuando encuentran una raíz hospedera involucran cambios en la expresión de genes involucrados en la síntesis de factores Nod. Estos genes permiten ventajas competitivas frente a otros organismos para el acceso a los sustratos provenientes de la raíz de la planta hospedera. Estos ayudan a la adherencia a superficies radiculares, y conferir a sustancias tóxicas tales como fitoalexinas secretadas por la raíz (Gage, 2004).

Durante las fases tempranas de la simbiosis, los rizobios deben dirigirse de la superficie de la raíz al interior del tejido radicular poblando el nódulo incipiente enmarcado en lo que se denomina tubo de infección. La formación del tubo de infección inicia cuando los rizobios son atrapados entre dos paredes celulares de los pelos radiculares (Ver figura 2).



Esto usualmente ocurre cuando un pelo radicular forma un “rizo”, y la bacteria se une al pelo radicular y es atrapada entre las paredes celulares. La invaginación de la pared celular en el rizo, o la degradación de la pared y la invaginación de la membrana celular es seguida por el crecimiento de la punta, resultado de la invaginación en la iniciación del tubo de infección que crece hacia abajo, dentro del pelo radicular y dentro del cuerpo de las células epidérmicas (Gage, 2004). Los rizobios dentro del tubo de infección crecen y se dividen, llenándose de bacterias. Si el tubo de infección sale de las células epidérmicas, hay entonces una fusión con las paredes celulares y las células distales y así la bacteria entra en el espacio intercelular entre la célula epidérmica y la capa intercelular. La ramificación del tubo como su crecimiento a través de la raíz y la entrada al primordio del nódulo incrementa el número de sitios a través de los cuales la bacteria puede sacar el tubo y entrar a las células de los nódulos, asegurando el número suficiente de células del nódulo colonizadas. La bacteria dentro del tubo de infección eventualmente entra y sale a las células del nódulo. Frecuentemente dentro de las células nodulares, las bacterias continúan con la diferenciación y la síntesis de proteínas requeridas para la fijación de nitrógeno y para el mantenimiento de las relaciones mutualistas (Gage, 2004).



**Figura 2.** Dinámica de formación de un nódulo en la raíz en una leguminosa causada por *Rhizobium*. (Tomado de Vanderleyden y Pieterse. 1995).

1. *Rhizobium* libre
2. *Rhizobium* atraído por el pelo radical
3. Inicio de la infección por *Rhizobium* en el pelo radical
4. Cayado del pastor (pelos radicales infectados por *Rhizobium*)
5. El cordón de infección de *Rhizobium* invade la matriz de células corticales de la leguminosa en la raíz
6. El cordón de infección de *Rhizobium* invade la matriz de células corticales de la leguminosa en la raíz
7. *Rhizobium* se reproduce en células haploides de la raíz y pierde su pared celular; se sobreproduce auxina
8. Resultado se da de la hipertrofia radical y aparece el nódulo
9. *Rhizobium* sin pared (bacteroide) en las células corticales fija nitrógeno
10. El nódulo con leghemoglobina fija nitrógeno

## 2.6 Inoculantes rizobianos

Los inoculantes son formulaciones comerciales que contienen rizobios, para ser aplicados a la semilla o al suelo durante la plantación. Está estimado que aproximadamente 2000 toneladas de inoculante son producidas anualmente en el mundo, una cantidad suficiente para inocular 20 millones de hectáreas de leguminosas (Rebah *et al.*, 2007). Casi el 50% son producidos en los Estados Unidos de América. Los inoculantes son generalmente comercializados en presentación sólida, en polvo como turba o en formas granuladas, o como inoculantes líquidos.

Existen otras formulaciones en etapa investigativa como productos concentrados basados en aceites, cultivos liofilizados, o células de rizobios atrapados en perlas. Los métodos de inoculación dependen del tipo de inoculante, los polvos y los líquidos son generalmente aplicados sobre las semillas, mientras que los inoculantes granulares son aplicados directamente al suelo (Rebah *et al.*, 2007).

Los inoculantes sólidos son preparados por la adición del medio de cultivo conteniendo una gran población de rizobios, a un soporte en polvo seguido por un periodo de maduración para asegurar la multiplicación o adaptación de las células. De este modo, la producción de una gran cantidad de rizobios en un medio líquido constituye el primer paso para la producción de inoculantes en polvo. El medio de cultivo estándar incluye manitol como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales minerales. Pequeñas modificaciones de éste, han sido empleadas para la producción a escala de laboratorio, pero este uso es limitado a su escala industrial debido a su alto costo (Rebah et al., 2007).

#### *2.6.1 Calidad en inoculantes rizobianos*

Los inoculantes comerciales han sido usados por más de un siglo, y ellos han contribuido al incremento de la productividad de los cultivos. Un buen inoculante debe ser preparado con una cepa de rizobio seleccionada por la alta eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno y la habilidad competitiva para la nodulación. La cepas deben sobrevivir en la formulación del inoculante manteniendo sus propiedades durante el almacenamiento, y tolerar factores de estrés tales como la acidez, la desecación, las altas temperaturas y los plaguicidas agroquímicos empleados en los cultivos. El factor más importante en la calidad de un inoculante es un alto número de rizobios viables ( $> 2 \times 10^9$  UFC/g) y ninguna o mínima contaminación por microorganismos o patógenos para plantas y humanos (Rebah et al., 2007).

## **2.7 Medios de cultivo**

Los medios de cultivo son soluciones nutritivas que se usan en el laboratorio y en la industria para el cultivo de microorganismos.

### *2.7.1 Clasificación de los medios de cultivo según su composición*

En microbiología, se usan dos tipos generales de medio de cultivo: los químicamente definidos y los complejos (o no definidos). Los medios definidos se preparan añadiendo cantidades precisas de compuestos orgánicos e inorgánicos purificados a un volumen de agua destilada. Por tanto, se sabe exactamente la composición química de un medio definido. Sin embargo, en muchos casos la composición exacta de un medio no es importante. A menudo los medio complejos emplean hidrolizados de caseína, carne, soya, levaduras y otras sustancias nutritivas. Tales hidrolizados están disponibles comercialmente en forma de polvo y pueden ser pesados con facilidad y disueltos en agua destilada para preparar un medio (Madigan *et al.*, 2002).

## **2.8 Nutrición microbiana**

Las bacterias tienen una capacidad enorme para utilizar una amplia gama de nutrientes que va desde compuestos inorgánicos simples a compuestos orgánicos más complejos. Los nutrientes se pueden dividir en 2 clases: esenciales, sin los cuales la célula no puede crecer, y no esenciales que se utilizan cuando están presentes pero no son indispensables. Algunos nutrientes son utilizados sólo como precursores de macromoléculas celulares y otros sólo como fuente de energía sin ser incorporados directamente al material celular, mientras que otros cumplen ambas funciones (Madigan *et al.*, 2002).

### 2.8.1 Macronutrientes

El carbono es el mayor constituyente de la célula bacteriana, De acuerdo a la forma en que lo utilizan tenemos fundamentalmente dos tipos de bacterias, las autótrofas, que son capaces de sintetizar casi todos sus componentes orgánicos a partir de compuestos inorgánicos como el  $\text{CO}_2$ ; y las heterótrofas, que utilizan sustancias orgánicas como fuente de carbono (Madigan *et al.*, 2002).

La glucosa, por ejemplo, es utilizada como fuente de carbono y fuente de energía. También existen bacterias que pueden usar una variedad de otras sustancias orgánicas como fuente parcial o exclusiva de carbono. Entre las bacterias más versátiles se encuentra las del género *Pseudomonas*, muchas de las cuales pueden utilizar más de 100 compuestos orgánicos. Después del carbono el elemento más abundante en la célula es el nitrógeno, representa entre el 12 y el 15% del peso seco, y es el constituyente principal de proteínas y ácidos nucleicos. La mayoría de las bacterias son capaces de utilizar el amonio como fuente de nitrógeno, mientras que otras pueden usar los nitratos. La reducción de nitratos, se puede lograr por 2 mecanismos diferentes. El primero por reducción asimiladora, en la cual es reducido por la vía del nitrito, y el segundo por reducción desasimiladora, en donde el nitrato sirve como aceptor final de electrones. La primera está bastante extendida entre las bacterias mientras que la segunda sólo es común en bacterias anaerobias y anaerobias facultativas (Madigan *et al.*, 2002).

El fósforo es utilizado para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. La mayoría de las bacterias lo usan en forma inorgánica como  $\text{PO}_4^-$ . Los fosfatos orgánicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, pero para ser utilizados deben ser atacados primero por fosfatasas, enzimas que rompen estos compuestos liberando fósforo inorgánico. Aunque requeridos en cantidades muy pequeñas los micronutrientes son importante, entre los que destacamos el cobalto, cobre y manganeso (Madigan *et al.*, 2002).

Los factores de crecimiento también son de vital importancia, ya que son sustancias que deben ser aportadas preformadas, ya que la bacteria que las requiere no las puede sintetizar a partir de los nutrientes más simples, por falla o ausencia de una vía metabólica. Estas sustancias incluyen vitaminas del complejo B, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Las bacterias que no requieren factores de crecimiento se denominan prototróficas y las que los requieren, auxotróficas para ese factor (Madigan *et al.*, 2002).

### 2.8.2 Oxígeno

Las exigencias de oxígeno de una bacteria en particular reflejan en parte el tipo de metabolismo productor de energía. De acuerdo a su relación con el oxígeno tenemos varios grupos como los anaerobios obligados, y dentro de ésta categoría se encuentran 2 tipos, estrictos y aerotolerantes. Los primeros crecen en ausencia de oxígeno. Los segundos también crecen sólo en ausencia de oxígeno pero toleran su presencia. Un segundo grupo son los anaerobios facultativos, los cuales son capaces de crecer en presencia o ausencia de oxígeno. En una tercera categoría encontramos a los aerobios obligados, los cuales requieren oxígeno para su desarrollo. Por último existen los microaerófilos, que crecen mejor con tensiones de oxígeno bajas (3%-5%), las concentraciones elevadas (alrededor de 21%) tienen un efecto inhibitorio para estas bacterias (Madigan *et al.*, 2002).

El dióxido de carbono también puede ser suministrado como nutriente. Algunas bacterias como *Neisseria* y *Brucella* tienen varias enzimas con baja afinidad por el CO<sub>2</sub> y requieren una concentración más elevada (10%) de la que habitualmente está presente en la atmósfera (0.03%). Estos requerimientos atmosféricos deben ser tenidos en cuenta cuando se realice el cultivo de estas bacterias (Madigan *et al.*, 2002).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General:**

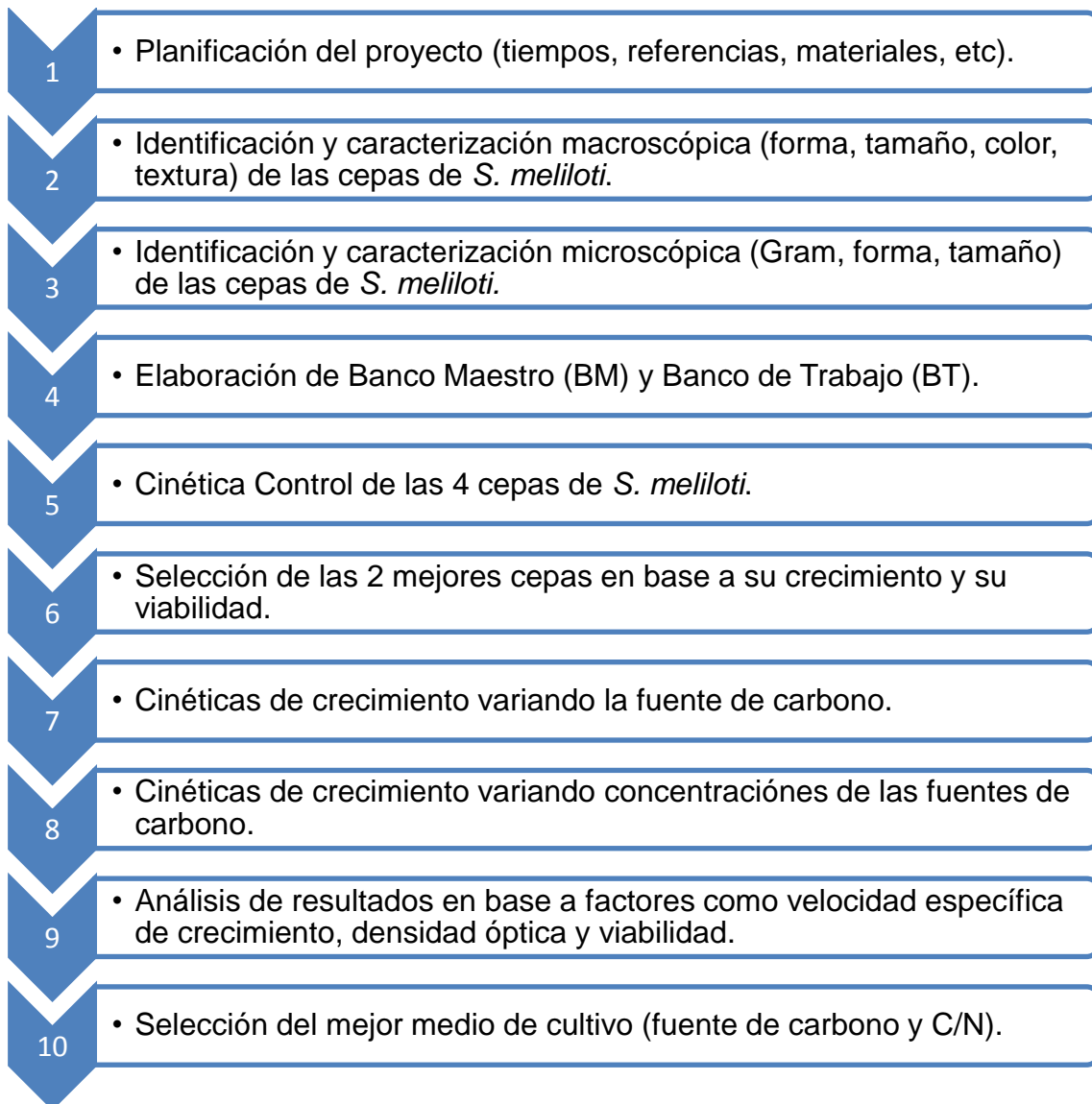
Optimizar el medio de cultivo de las cepas de *S. meliloti* mediante el estudio del comportamiento cinético con la finalidad de obtener un inoculante (biomasa) para su uso como biofertilizante.

#### **3.2 Objetivos Particulares:**

- 1.- Estudio cinético de cuatro cepas de *S. meliloti* (A, B, C y D) para posteriormente seleccionar las 2 más eficientes (con base en su crecimiento y velocidad específica de crecimiento).
- 2.- Elaboración de los correspondientes Banco Maestro (BM) y de Trabajo (BT) de *S. meliloti* como punto de partida para los ensayos cinéticos.
- 3.- Optimización de las condiciones nutricionales mediante la variación de la fuente de carbono.
- 4.- Establecer el o los sustratos con mayor incidencia sobre el desarrollo de las cepas de *S. meliloti*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cuadro metodológico





## 4.2 Identificación de las cepas

La identificación primaria o caracterización de las cepas aisladas de *S. meliloti* se realizó de la siguiente manera:

4.2.1 *Caracterización de las colonias en medio sólido (Medio PY)*. Para esto se utilizó una técnica de sembrado para obtener un aislamiento primario y distinguir las colonias entre sí. A continuación, las placas se incubaron a una temperatura de 30° C hasta observar crecimiento en la placa. (Hernández y Santillán, 1993).

4.2.2 *Tinción de Gram*. Inicialmente, se colocó en un portaobjetos limpio, una gota de agua destilada. Se tomó con asa estéril una colonia y se realiza una suspensión homogénea en la gota de agua, extendiéndola para formar una película delgada. Se dejó secar al aire para posteriormente fijar la preparación al calor; para lo cual se pasó el portaobjetos por su parte posterior sobre la flama del mechero. Ya que se secó la muestra, ésta se cubrió con cristal violeta durante 1 min. Se dejó escurrir el colorante y se lavó con agua. Se cubrió con Lugol durante 1 min y se escurrió sin lavar. Se decoloró con alcohol-acetona (de 5 a 15 segundos) y se lavó con agua. Finalmente, se cubrió la preparación con safranina por 1 min, se lavó y se dejó secar al aire. Se observó la muestra en un microscopio marca Zeiss, modelo Axiostar plus con el objetivo de inmersión (100x). Los Gram (+) se tiñen de azul o púrpura y los Gram (-) de rojo (Hernández y Santillán, 1993).

### 4.2.3 Diseño de los medios de cultivo

Los sustratos utilizados como fuente de carbono para la elaboración de los medios fueron: manitol (YEM), sacarosa (YES), glucosa (YEG) y fructosa (YEF).

Los demás componentes de la formulación como la fuente de nitrógeno y las sales se mantuvieron constantes y lo único que se hizo fue variar la fuente de carbono así como su concentración en función a la relación de cantidad de carbono con respecto a la de nitrógeno (relación C/N). En la tabla 1 se presenta el medio de cultivo original con respecto a los medios diseñados así como las variaciones en concentración de acuerdo a su relación C/N.

Los niveles de variación de pH y temperatura se establecieron en función del rango reportado para el crecimiento del *Rhizobium sp* (Kuykendall et al., 2005). La velocidad de agitación se tomó con base en las fermentaciones a nivel matraz para esta bacteria que es de 200 rpm, dado que Deppler y Perlman, (1979) sugiere que una fermentación a nivel matraz con una agitación mecánica, sea realizada a velocidad próxima de 220 rpm.

**Tabla 1.** Comparación medio de cultivo original con respecto a los diseñados

Componente	C/N 50 Mínimo (g/L)	C/N 73 Control (g/L)	C/N 100 Máximo (g/L)
<i>Sales</i>	0.8	0.8	0.8
<i>Extracto de Levadura</i>	0.5	0.5	0.5
<i>y como fuente de carbono cualquiera de las siguientes:</i>			
<i>Manitol</i>	6.30	10.0	12.6
<i>Sacarosa</i>	5.90	9.38	11.9
<i>Glucosa</i>	6.20	9.75	12.5
<i>Fructosa</i>	6.20	9.75	12.5

### **4.3 Cinética Control y Selección de Cepas**

Se llevó a cabo una cinética de crecimiento como “control” con las 4 cepas (A, B, C y D) proporcionadas por Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V. en compañía del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM y provenientes del banco de trabajo (BT) previamente elaborado. Esta cinética fue realizada por duplicado en matraz Erlenmeyer de 500 mL utilizando, 100 mL del medio de cultivo control (YEM), manteniendo el pH inicial cercano a la neutralidad, la temperatura en un intervalo de 28 a 32° C y la agitación a 200 rpm. Para el experimento se utilizó una incubadora con agitación marca New Brunswick Scientific Classic Series modelo C25. El crecimiento celular fue medido mediante absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Genesys 5 Thermoline. Una vez terminada la cinética control, dentro de las 4 cepas se seleccionaron 2 las cuales cumplieran con requisitos como aquellas que tuvieran la mayor cantidad de biomasa para el inoculante y que tuvieran alta viabilidad; para lo cual se evaluaron parámetros como concentración celular, velocidad específica de crecimiento y viabilidad (conteo de UFC). En esta fase también se decidió que fuentes de carbono utilizar para los ensayos próximos, en función de la disponibilidad en el laboratorio y del costo de éstos.

### **4.4 Cinéticas de Crecimiento**

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo manteniendo constantes todos los nutrientes, excepto el nutriente en variación (fuente de carbono).

El medio de cultivo se inoculó siempre con un 4% respecto al volumen total del medio, según preparación de inóculo en la cinética control. Las concentraciones del nutriente en variación fueron las marcadas como máximo, control y mínimo como se estableció en la tabla 1. Se mantuvieron constantes la temperatura en un intervalo de 28 a 32° C y agitación de 200 rpm; el pH se ajustó cercano a la neutralidad. Para el experimento se utilizó una incubadora con agitación marca New Brunswick Scientific Classic Series modelo C25.

Estas cinéticas se realizaron por duplicado y se tomaban muestras cada 3 ó 4 horas, hasta que el cultivo llegara a fase estacionaria (30 h aproximadamente). El crecimiento celular fue medido por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro marca Thermoline modelo Genesys 5.

#### 4.5 Pruebas de Viabilidad (Cuenta en Placa)

Una vez finalizada las cinéticas de crecimiento, se procedió a realizar las pruebas de viabilidad (cuenta de UFC en placa) en cajas Petri con medio de cultivo PY (Tabla 2). Para esta prueba se almacenaron en tubos de fondo cónico de 50 mL, muestras de los últimos puntos o monitoreos finales de las correspondientes cinéticas. La técnica consistió en lo siguiente:

Se realizaron series de diluciones seriadas en factor de 10 del medio de cultivo bacteriano en fase estacionaria. De cada una de las diluciones se tomaron 100 µL y se distribuyeron sobre la placa de agar PY con ayuda de una varilla de vidrio estéril en forma de triángulo.

Se mantuvo la placa sin mover hasta que el inóculo fue absorbido por el agar; se invirtieron las placas y se incubaron a 30° C por 24-36 horas o hasta que el crecimiento fue apreciable. Se hizo un conteo del número de colonias que aparecieron y se multiplicó el resultado por el inverso de la dilución, para finalmente reportar el resultado como UFC/mL (Hernández y Santillán, 1993).

La descripción del medio PY se encuentra en la siguiente tabla:

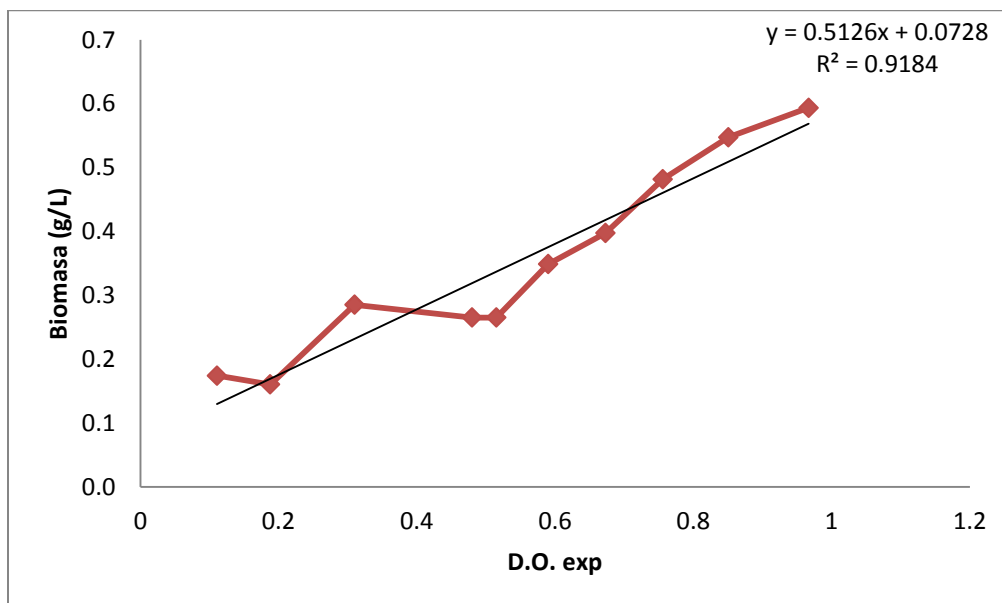
**Tabla 2.** Composición medio PY. Reportado por Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V.

<i>Componente</i>	<i>g/L</i>
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	0.72
<i>Extracto de Levadura</i>	3.0
<i>Peptona de Caseína</i>	5.0
<i>Agar</i>	15

#### 4.6 Curva estándar peso seco

Se trabajó con tubos Eppendorf previamente pesados y puestos a peso constante en una estufa a 90° C, esto con el fin de eliminar toda la humedad. Se dejaron los tubos dentro de la estufa durante 12 horas y se pesaron los mismos. Para cada muestra se tomó un volumen de 1.5 mL en cada tubo (10 en total por la escala de D.O. que se considera de 0.1 a 1.0), se centrifugó y se desechó el sobrenadante; esto con la finalidad de concentrar el pellet celular.

Se repitió esta misma operación hasta completar un volumen aproximado de 6.0 mL y se percibió claramente un aumento en el paquete celular. Finalmente, se dejaron secar los tubos con la biomasa en la estufa durante un día y se efectuó la resta del peso del tubo con biomasa menos el tubo vacío y se dividió entre el volumen utilizado para obtener el peso de la biomasa en g/L. La curva estándar se presenta en la figura 3.



**Figura 3.** Curva estándar peso seco ensayo cepa A.

Como se mencionó anteriormente, el peso seco (contenido de sólidos) de las células bacterianas que se encuentran en una suspensión se obtiene por el secado de un volumen en una estufa a 100°C aproximadamente hasta peso constante. Se considera que esta técnica es útil para grandes volúmenes de muestra, debido a que diferencias hasta del orden de los miligramos representan el peso de un gran número de bacterias.

La desventaja de este método es que componentes volátiles de la célula pueden perderse por el secado y puede existir degradación. También la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene una humedad relativa alta. Estos ensayos se hicieron por duplicado y exclusivamente para la cepa A como prueba, sin embargo por llevar a cabo otros ensayos no se realizó para la cepa B, pero se piensa que los resultados podrían ser similares.

Como podemos apreciar en las curvas estándar de peso seco, existe una relación directamente proporcional entre la absorbancia y el peso seco, sin embargo esto sólo se aplica para suspensiones diluidas de bacterias como en este caso. Se recomienda que estas suspensiones tengan una absorbancia mayor a 0.6, ya que valores mayores producen desviaciones de la ley de Lambert-Beer. Desafortunadamente, el inconveniente de utilizar suspensiones diluidas puede involucrar un mayor error de pipeteo y menor sensibilidad por el bajo nivel de absorción, como lo podemos ver en las gráficas ya que la tendencia que se esperaría en algunos puntos no es la correcta además de el bajo valor del coeficiente de correlación obtenido de la ecuación de la curva. A pesar de este valor de línea de tendencia, los datos de las pendientes considerados como factores de conversión de las ecuaciones, se encuentran dentro del rango para aceptarse como eficiente; ya que el factor de conversión oscila entre 0.3-0.5.

#### **4.7 Banco de Trabajo**

Partiendo de las cepas en caja Petri, se realizó un crecimiento de todas en matraces Fernbatch de 2 L con 400 mL de medio YEM bajo las siguientes condiciones: 28-32° C, 200 rpm y pH cercano a la neutralidad. Se detuvo su crecimiento ya que habían alcanzado la fase exponencial (aproximadamente 12 h de cultivo con una D.O. de 0.5-1.0), y se dividió la biomasa en tubos de plástico de 200 mL; se centrifugó a 10,000 rpm (Beckman modelo J2-MV) por 15 min a 18° C. Una vez finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en el tubo, hasta 20 mL, con medio nuevo YEM con glicerol al 50%. Finalmente, se llenaron 25 crioviales por cada cepa y se almacenaron en el ultracongelador a -70° C.

#### **4.8 Cultivo de *S. meliloti* C y D en biorreactores de 12 L.**

El equipo utilizado fue un biorreactor New Brunswick Scientific con capacidad de 14 L (volumen nominal), equipado con electrodos de pH y oxígeno disuelto, y agitado mediante 3 turbinas o impulsores Rushton ( $D/T = 1/3$ ). Los experimentos se llevaron en un cultivo para la cepa C y otro para la cepa D en 10 L de medio de cultivo YEM, el cual se preparó en el biorreactor y se esterilizó a 120° C por 25 min.

El suministro de oxígeno se hizo mediante aire estéril (filtro Sartorius 0.22  $\mu\text{m}$ ). Se fijó una aireación de 1.0 vvm manteniendo la tensión de oxígeno disuelto superior al 90 %. El pH se mantuvo cercano a la neutralidad controlándolo con soluciones de hidróxido de sodio (3 M) y ácido fosfórico (1:1 v/v). La temperatura se mantuvo en  $30 \pm 0.5$  °C, y la agitación a 200 rpm (Hernández y Santillán, 1993).

El inóculo se preparó en 4 matraces tipo Fernbatch de 2 L con 500 mL de cada uno, conteniendo las 4 cepas correspondientes (A, B, C y D) a 30° C y 200 rpm; esto con la finalidad de seleccionar las 2 cepas con mayor densidad óptica para la producción, que fueron la cepa C y cepa D.

Se observaron también los datos de los parámetros obtenidos a partir del controlador para los reactores como lo son temperatura (° C), oxígeno disuelto (%), agitación (rpm), y pH. La tomas de lectura y muestra así como las determinaciones de D. O. y pH fueron cada 2 h. Finalmente, una vez alcanzados los cultivos la fase estacionaria se procedió con el envasado en condiciones estériles en recipientes de plástico en presentaciones de 4.0 y 1.0 L. Los recipientes se dejaron reposar y se almacenaron a temperatura ambiente para posteriores análisis en invernadero y campo de cultivo. El proceso del cultivo tuvo una duración de 22 h para la cepa C y de 18 h para la D. Tiempo después se comprobó la viabilidad celular de las últimas muestras de los reactores mediante la técnica de conteo en placa.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

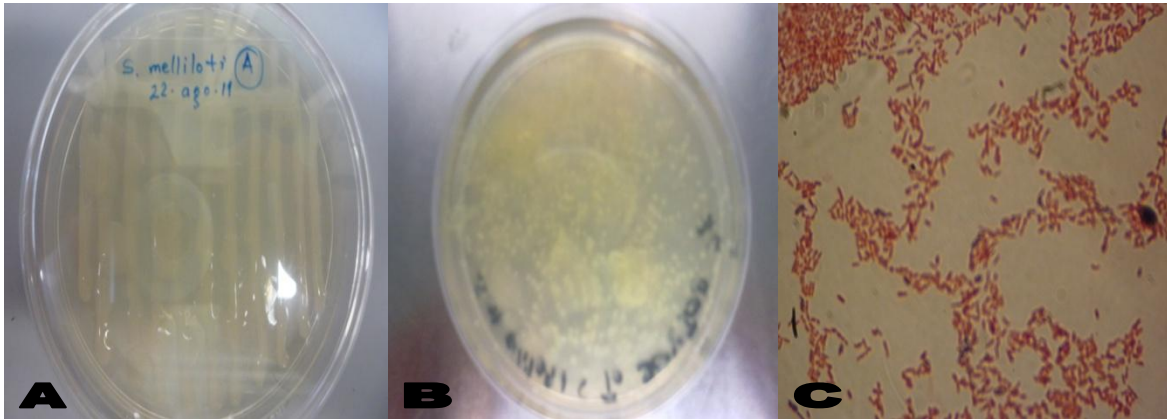
### 5.1 Caracterización y pureza de las cepas

Como se mencionó en la metodología, a las cepas recibidas por parte de la empresa se les practicaron las pruebas de caracterización macroscópica (forma, tamaño, color y textura) y microscópicas (Gram, forma).

En cuanto a la morfología colonial, los resultados obtenidos concuerdan con la descripción de Kuykendall *et al.* (2005), ya que las colonias de las 4 cepas de *S. meliloti* (A, B, C y D) resultaron ser de color blanco o beige, de forma circular convexa, semitraslúcidas u opacas, de textura mucosida y gomosa, y de tamaño variable dependiendo del número de días de incubación; ya sea colonias chicas, con un diámetro de 1 a 2 mm con menos de 48 h de incubación y colonias grandes, usualmente de 2 a 4 mm de diámetro dentro de 3 a 5 días de incubación en medio con levadura, manitol, sales y agar a 30° C.

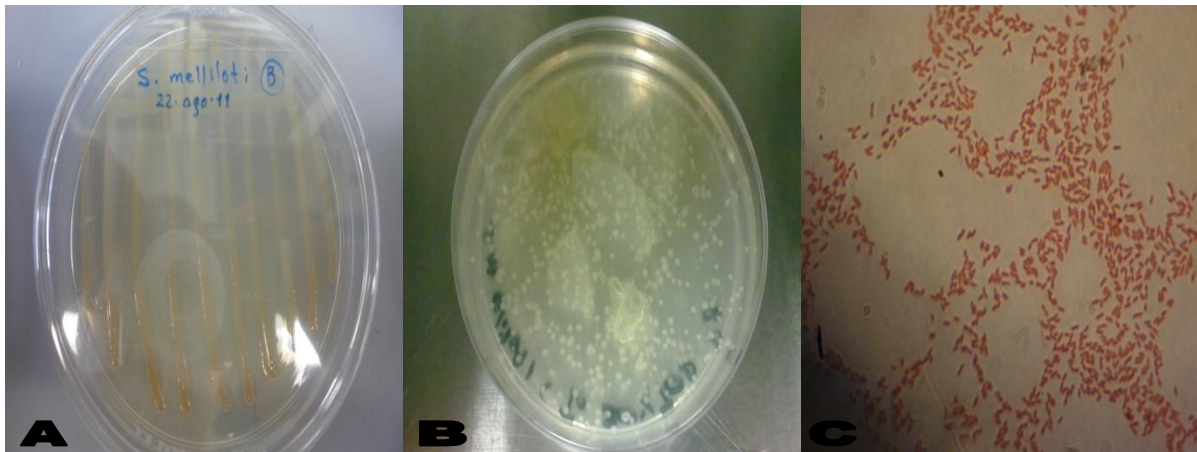
Por otra parte, en la observación microscópica, se pudo observar que son bacilos pequeños Gram negativos y de acuerdo a Kuykendall *et al.* (2005), su tamaño puede ser de 0.5-1.0 X 1.2-3.0  $\mu\text{m}$ .

La morfología colonial y las observaciones microscópicas de las 4 cepas de *S. meliloti* se pueden observar en las figuras 4 a 7.



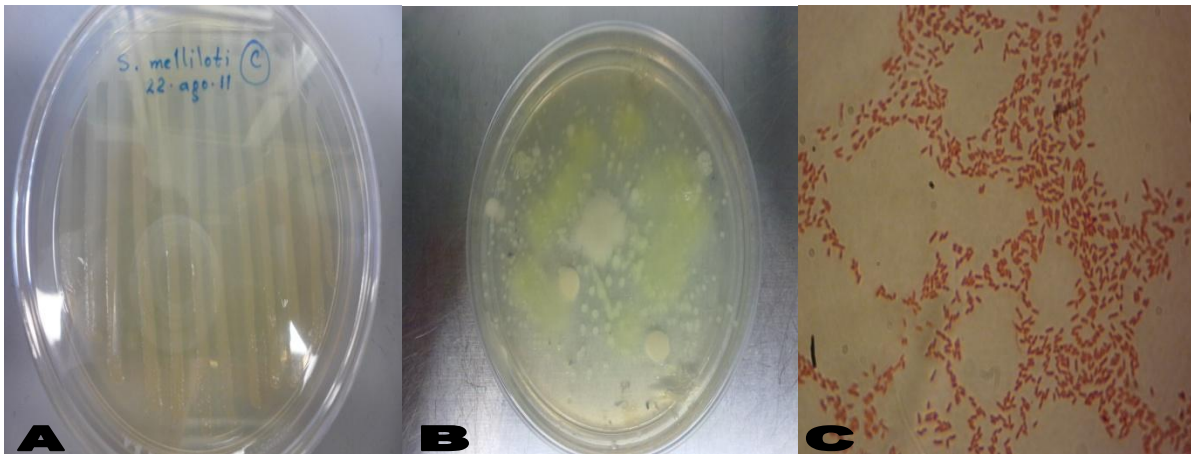
**Figura 4. Morfología Macroscópica y Microscópica *S. meliloti* A.**

- A)** Observación macroscópica *S. meliloti* A en caja. **B)** Colonias típicas *S. meliloti* A  
**C)** Observación microscópica 100X *S. meliloti* A.



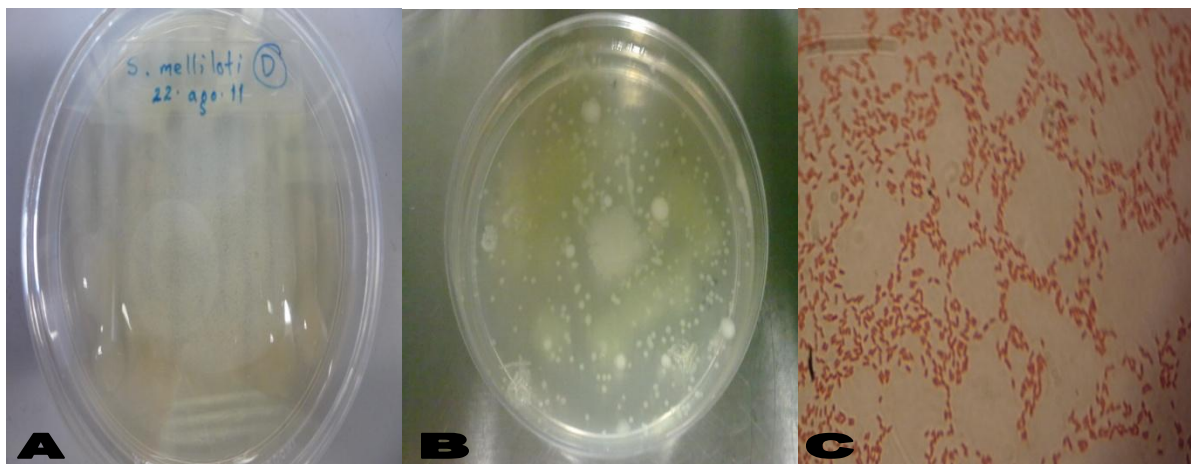
**Figura 5. Morfología Macroscópica y Microscópica *S. meliloti* B.**

- A)** Observación macroscópica *S. meliloti* B en caja. **B)** Colonias típicas *S. meliloti* B.  
**C)** Observación microscópica 100X *S. meliloti* B.



**Figura 6. Morfología Macroscópica y Microscópica *S. meliloti* C.**

- A)** Observación macroscópica *S. meliloti* C en caja. **B)** Colonias típicas *S. meliloti* C.  
**C)** Observación microscópica 100X *S. meliloti* C.



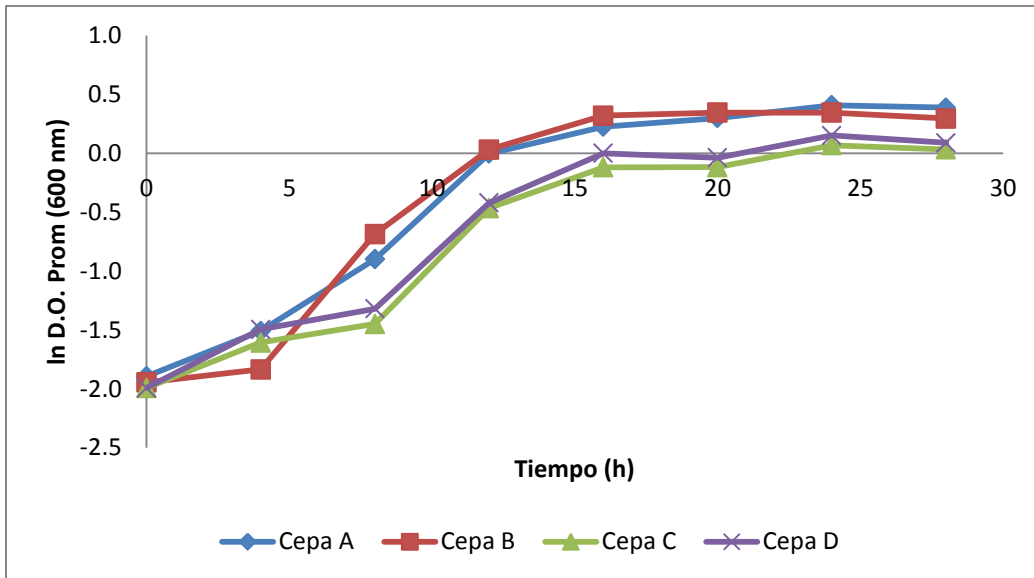
**Figura 7. Morfología Macroscópica y Microscópica *S. meliloti* D.**

- A)** Observación macroscópica *S. meliloti* D en caja. **B)** Colonias típicas *S. meliloti* D.  
**C)** Observación microscópica 100X *S. meliloti* D.

## 5.2 Cinética Control (Banco Original)

Lo que se pretendió en este primer ensayo denominado como “control” fue analizar el comportamiento cinético de crecimiento de las 4 cepas de *S. meliloti* en el medio inicial (YEM) propiedad de la Empresa Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V. Como se observa en la figura 8, existe una diferencia de crecimiento entre las cepas A y B con respecto a C y D, dando densidades ópticas máximas de aproximadamente 1.4 u.a. para las primeras 2 cepas, mientras que para C y D alcanzaron una lectura de 1.0 u.a. Analizando las curvas de crecimiento, el tiempo que constituye la fase lag de la cepa B (cerca de 4 h) es menor en comparación con los tiempos de las cepas restantes (cerca de 8 h); lo que nos habla de una adaptación más rápida al medio por parte de la cepa B.

Se determinan similitudes en el tiempo de crecimiento entre las cepas A y B, llegan al máximo de crecimiento a las 16 h aproximadamente, al igual que para las cepas C y D lo que nos permitiría proponer algún tipo de similitud fisiológica y cinética. Lo siguiente se suma a los datos de la tabla 3, donde se presenta la comparación de los valores de las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y de viabilidad de las distintas cepas de *S. meliloti*. Se comprobó que las cepas A y B crecieron más rápido que C y D; siendo B la que arrojó los valores más altos, y A valores ligeramente superiores con respecto a C y D. Este hecho se puede corroborar con el recuento de colonias al final del cultivo, ya que A y B obtuvieron mayor cantidad de UFC, lo que nos habla que la velocidad específica de crecimiento en este caso, es directamente proporcional a la viabilidad al final de la fermentación.

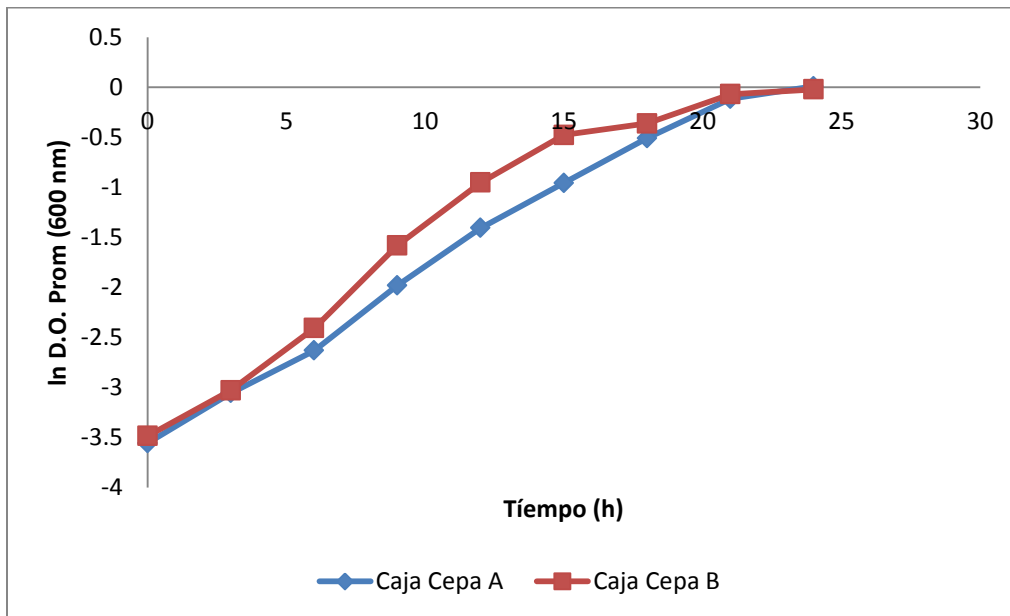


**Figura 8.** Comparación cinética control (banco original) de las 4 cepas de *S. meliloti*. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar es menor a +/- 0.05

**Tabla 3.** Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad entre las cepas de *S.meliloti*.

Cepa	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	UFC /mL	Productividad(UFC*mL/h)
A	0.18	$6.6 \times 10^9$	$2.3 \times 10^8$
B	0.23	$7.2 \times 10^9$	$2.6 \times 10^8$
C	0.17	$6.3 \times 10^9$	$2.2 \times 10^8$
D	0.14	$6.1 \times 10^9$	$2.1 \times 10^8$

Adicionalmente, se llevó a cabo un cultivo para verificar el crecimiento de las cepas A y B a partir de una colonia aislada proveniente de la caja bajo las mismas condiciones. Esta cinética tuvo como objetivo comparar el comportamiento cinético de las células que provenían de la criopreservación con respecto a las que venían directamente de caja y comprobar si la criopreservación es buen método para el almacenamiento de las cepas de *S. meliloti* (figura 9) o si fuera recomendable almacenar las células a otro tipo de condiciones; todo con la finalidad de evitar un decremento en la viabilidad para futuras inoculaciones.



**Figura 9.** Comparación cinética de las cajas de cultivo de *S. meliloti* A y B (banco original). El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar es menor a +/- 0.05

Los valores de velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ) y los de viabilidad (UFC/mL) respectivamente son  $0.16 h^{-1}$  y  $2.5 \times 10^9$  UFC/mL para la cepa A y  $0.21 h^{-1}$  y  $5.0 \times 10^9$  UFC/mL para la cepa B. Ahora bien, si comparamos las figuras 8 y 9 (cinética control y cinética de caja), observamos que los valores de caja, tanto de densidad óptica como el de la velocidad específica de crecimiento son ligeramente menores a pesar de que los de viabilidad se mantienen similares entre sí. Las concentraciones de biomasa alcanzadas en los cultivos de banco fueron aproximadamente 50% mayores a las de caja. Lo siguiente lo podemos apreciar en la tabla 4.

**Tabla 4.** Comparación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y densidad óptica (600 nm) para las cepas A, B, C y D de *S. meliloti* de cultivos en caja y banco. Los datos de biomasa se presentan normalizados con respecto a los cultivos de caja.

Cepa	$\mu$ ( $h^{-1}$ )		Densidad óptica (600 nm) (24 h)	
	Cultivo de caja	Criopreservación	Cultivo de caja	Criopreservación
<b>A</b>	0.16 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	1 $\pm$ 0.10	1.5 $\pm$ 0.10
<b>B</b>	0.21 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.01	1 $\pm$ 0.01	1.45 $\pm$ 0.10
<b>C</b>	ND	0.17 $\pm$ 0.01	ND	1.11 $\pm$ 0.10
<b>D</b>	ND	0.14 $\pm$ 0.01	ND	1.16 $\pm$ 0.10

De acuerdo a los resultados anteriores se propone que la construcción de bancos maestros y de trabajo bajo las condiciones criopreservación es recomendable para las cepas de *S. meliloti*. Este aspecto es muy importante ya que los cultivos para las bacterias fijadoras de nitrógeno, así como para otros cultivos microbianos son extremadamente vulnerables a las malas condiciones de almacenamiento y a los cambios bruscos de temperatura (Snell, 1984). Mantener a las bacterias en estado viable y sin modificaciones en sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas es uno de los problemas que tanto los investigadores como los productores de inoculantes enfrentan; y que además es poco estudiado y aún menos divulgado (Plazas, 2007).

Considerando entonces los métodos más adecuados para la conservación de los microorganismos, y en específico de *S. meliloti*, se encuentra el almacenamiento en nitrógeno líquido, que sería el mejor; sin embargo, debido a la posibilidad de interrupción en la disponibilidad de nitrógeno siempre debe mantenerse una colección en duplicado conservada por otro método. En general, las grandes colecciones de cultivos conservan las cepas mediante dos o más procedimientos y esto es lo más recomendable, no importa cuál sea el tamaño del cepario (Monroy y Meza, 2002).

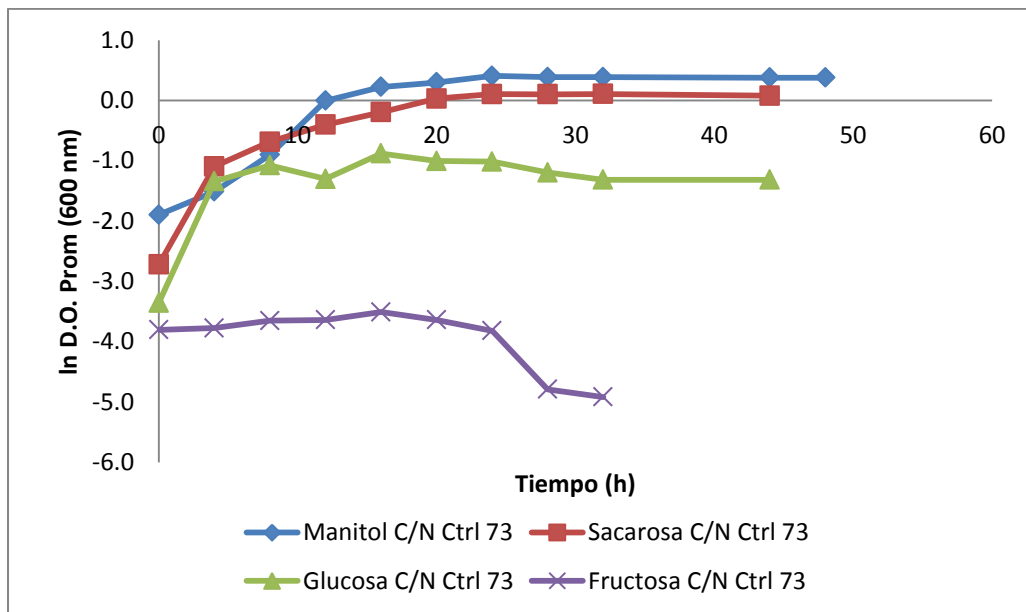
También es necesario mantener una colección secundaria para los trabajos de rutina (investigación, producción de inoculantes, etc) de esta forma el Banco Maestro queda protegida del riesgo de contaminación o pérdida y sirve como última fuente y referencia. (Snell, 1984).

La liofilización es también una alternativa cuando el uso del nitrógeno no es posible. Sin embargo, debido al costo del equipo necesario, generalmente no es accesible para quien trabaja con colecciones pequeñas. La opción para un determinado método debe considerar el número de cultivos a ser conservados, la frecuencia de uso de cultivos y el tiempo de conservación requerido además del clima, equipamiento, espacio físico, mano de obra experimentada y otras facilidades disponibles. Independientemente de la opción realizada, el método seleccionado debe ser evaluado periódicamente para garantizar su eficiencia. Esa evaluación debería incluir si se puede, además de la observación periódica de las características de la cepa, una prueba de infección en la planta. (Freire y Sato, 1999).



### 5.3 Variación fuente de carbono cepas A y B (Banco Original)

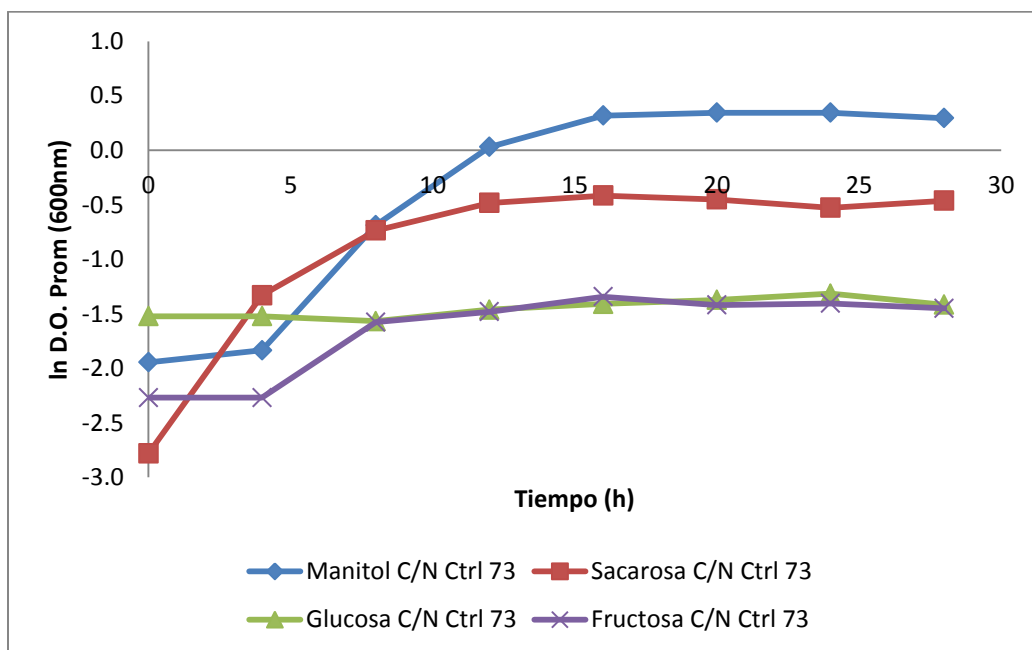
En las figuras 10 y 11 se presentan las cinéticas de crecimiento para las cepas A y B, cuando bajo la misma relación C/N 73 (control), cuando se evaluaron cuatro fuentes de carbono (manitol, sacarosa, glucosa y fructosa). Los resultados en estas pruebas muestran ampliamente la preferencia de las cepas por el manitol. En segundo lugar se encontró la sacarosa, obteniéndose una biomasa de menos de la mitad a diferencia de lo que se obtuvo con el manitol; pero en lo que respecta a glucosa el crecimiento fue aún menor y en fructosa finalmente no se observó crecimiento. Los valores de las velocidades específicas de crecimiento así como el recuento de colonias para las cepas A y B se presentan en las tablas 5 y 6 respectivamente.



**Figura 10.** Comparación cinética de la variación de la fuente de carbono para la cepa A. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar es menor a +/- 0.05

**Tabla 5.** Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de la cepa A variando la fuente de carbono.

Fuente de carbono	$\mu$ (h-1)	UFC/mL	Productividad (UFC*mL/h)
Manitol	0.18	$4.6 \times 10^8$	$1.6 \times 10^7$
Sacarosa	0.15	$2.2 \times 10^8$	$7.8 \times 10^6$
Glucosa	0	$2.3 \times 10^5$	$8.2 \times 10^3$
Fructosa	0	$1.7 \times 10^5$	$6.0 \times 10^3$



**Figura 11.** Comparación cinética de la variación de la fuente de carbono para la cepa B. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm En todos los casos la desviación estándar es menor a +/- 0.05

**Tabla 6.** Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de la cepa B variando la fuente de carbono.

Fuente de C	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	UFC/mL	Productividad (UFC*mL/h)
Manitol	0.22	3.0X10 <sup>8</sup>	1.0X10 <sup>7</sup>
Sacarosa	0.1	2.5X10 <sup>8</sup>	5.2X10 <sup>6</sup>
Glucosa	0	1.2X10 <sup>5</sup>	2500
Fructosa	0	1.0X10 <sup>5</sup>	2083

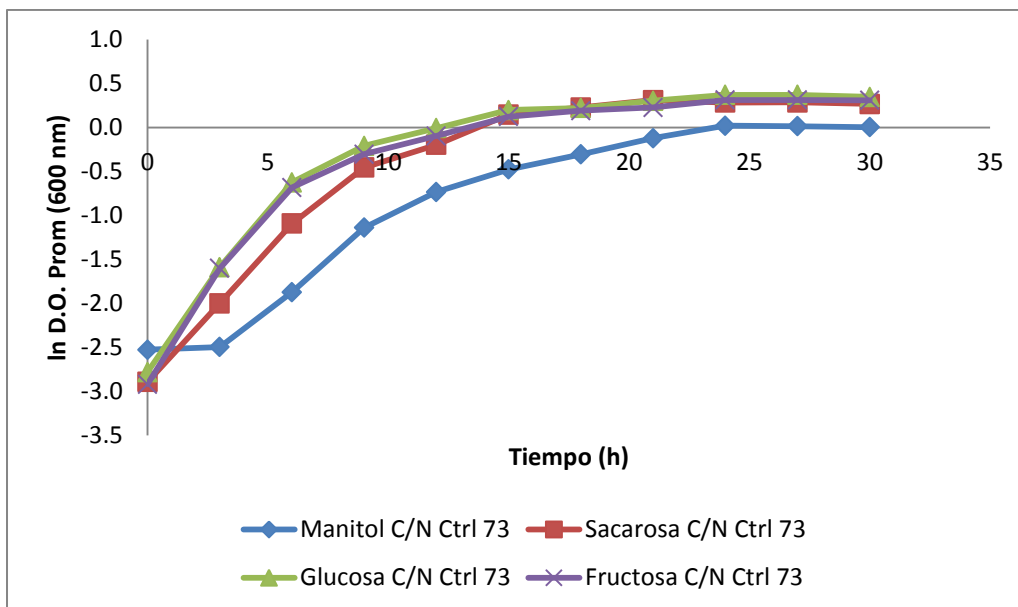
De acuerdo a su clasificación metabólica, *S. meliloti*, es considerado una bacteria de crecimiento rápido y los rizobios de crecimiento rápido utilizan una mayor variedad de fuentes carbonadas, siendo el manitol y la sacarosa los sustratos preferidos; como lo observamos en las figuras anteriores. Por otro lado el glicerol y las pentosas (L-arabinosa, xilosa, ribosa) son preferidos por las rizobios de crecimiento lento (Graham, 1975), es también en parte por este aspecto que se seleccionaron los sustratos correspondientes para los ensayos, además de su fácil disponibilidad en el laboratorio y su bajo costo.

Ahora bien, no se sabe con certeza el metabolismo de consumo de fuente de carbono de este tipo de bacterias, sin embargo se han hecho estudios y propuestas en lo que respecta al catabolismo de glucosa, fructosa, sacarosa, gluconato y arabinosa en diferentes especies de bacterias fijadoras de nitrógeno (Arias et al, 1982), y se demuestra en extractos acelulares la presencia de enzimas de las vías Entner-Doudoroff (ED), de pentosa fosfato (PF), y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) precisamente en este tipo de bacterias de crecimiento rápido; mientras que enzimas de ED y CAT en bacterias de crecimiento lento (Frioni, 1999).

Los resultados presentados en las figuras 10 y 11 donde el manitol es la fuente de carbono preferida por *S. meliloti*, no concuerda con los resultados de Ferry et al (1959), quién reportó que el crecimiento con glucosa es mejor para las cepas de *S. meliloti*. De cualquier forma, a pesar de las diferencias en las cepas y el tiempo en que se dejó el cultivo crecer, los resultados para ambos medios utilizados no son comparables por el simple hecho de tener ciertas diferencias marcadas, principalmente la fuente de nitrógeno, ya que la fuente que se utilizó fue extracto de levadura y en los ensayos de Ferry et al (1959) se empleó sulfato de amonio.

#### **5.4 Generación de un nuevo banco de trabajo**

Este banco de trabajo nuevo se realizó debido a algunos problemas que se presentaron durante los ensayos cinéticos de crecimiento con el banco original, ya que las densidades ópticas registradas eran bajas por lo cual se tenía la preocupación de que la viabilidad de las cepas estuviera decreciendo, o bien la sospecha que estuvieran contaminadas. Posteriormente se realizaron las observaciones microscópicas pertinentes a una muestra de cada cepa del banco original y se comprobó que efectivamente existía contaminación en el banco. Se realizó nuevamente una caracterización del comportamiento cinético de las cepas del nuevo banco que se elaboró. Los resultados del crecimiento se muestran en la figura 12, mientras que los valores de velocidad específica de crecimiento y el recuento de colonias se presentan en la tabla 7.



**Figura 12.** Comparación de la cinética control (Banco Nuevo) de las 4 cepas de *S. meliloti*. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.

**Tabla 7.** Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad entre las cepas de *S. meliloti* (banco nuevo)

Cepa	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	UFC/mL	Productividad (UFC*mL/h)
A	0.20	$2.1 \times 10^9$	$7.5 \times 10^7$
B	0.25	$1.8 \times 10^9$	$6.4 \times 10^7$
C	0.22	$2.2 \times 10^9$	$7.8 \times 10^7$
D	0.21	$1.9 \times 10^9$	$6.7 \times 10^7$

Nuevamente, se hizo una selección de las 2 cepas con base en las que obtuvieran rendimientos de crecimiento más elevados y que su viabilidad fuera mayor con respecto a las 2 cepas restantes. Sin embargo, en los resultados de la tabla anterior, apreciamos que no hay diferencia significativa entre ellos; por lo cual por decisión propia y considerando que ya se había trabajado con anterioridad con las cepas A y B, y en acuerdo con el encargado del proyecto se eligieron las cepas C y D para continuar con los demás ensayos.

### 5.5 Variación fuente de carbono cepas C y D (Banco Nuevo)

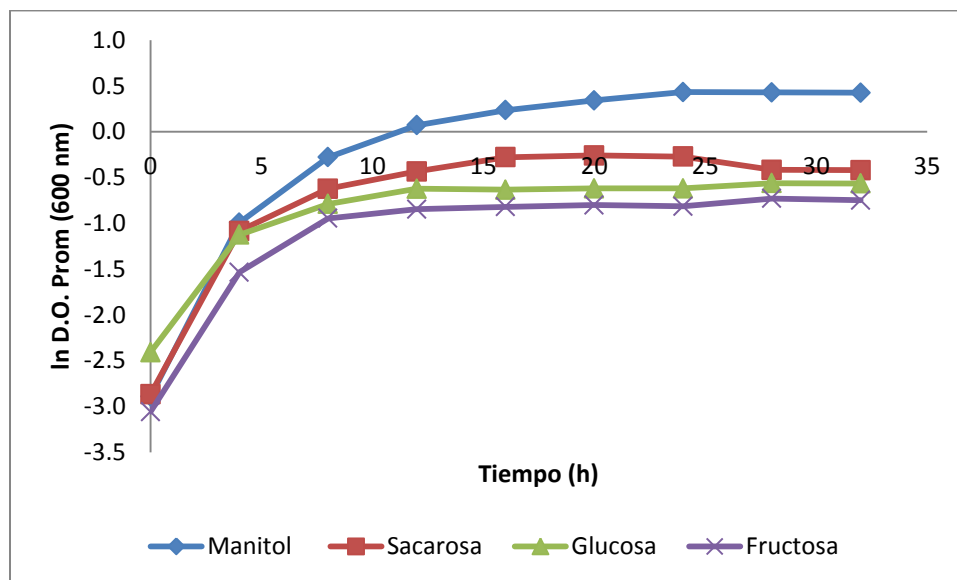
Como se mencionó en el marco teórico, los rizobios de crecimiento rápido, como *S. meliloti* consumen una amplia variedad de azúcares. Este hecho tiene que ver en gran medida con los metabolitos proporcionados por la planta hospedera. También es importante el sistema de transporte y el catabolismo de estas moléculas.

De acuerdo a Glenn y Dilworth (1981), los rhizobios de crecimiento lento aparentemente presentan una ausencia de enzimas para consumir y metabolizar los disacáridos. Esto no sucede así en las bacterias de crecimiento rápido cuyos sistemas para consumir este tipo de azúcares son dos; el constitutivo presente en organismos como *R. leguminosarum* y *R. trifolii* y el inducible presente en *R. meliloti*. Hay evidencia de que al menos existen dos vías para el consumo de disacáridos en bacterias de crecimiento rápido, la primera que transporta sacarosa, maltosa y trehalosa, y la otra lactosa (Glenn y Dilworth, 1981).

De acuerdo a Brenner *et al*, (2005), el género de *Rhizobium* y las alfaproteobacterias como *S. meliloti* poseen distintas rutas metabólicas para consumir los carbohidratos disponibles, como lo son la glicólisis, la vía de las pentosas y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Sin embargo, es muy probable que la vía Entner-Doudoroff, (figura 14) sea la ruta principal de consumo de la fuente de carbono (Brenner *et al.*, 2005)



En las figura 14 y tabla 8 se muestra el crecimiento con diferentes sustratos y los datos de velocidad específica de crecimiento así como los datos de viabilidad para la cepa C. Por otro lado, en la figura 15 se presenta la utilización de los mismos sustratos para la cepa D, y los respectivos datos de velocidad específica de crecimiento y los de viabilidad en la tabla 9.

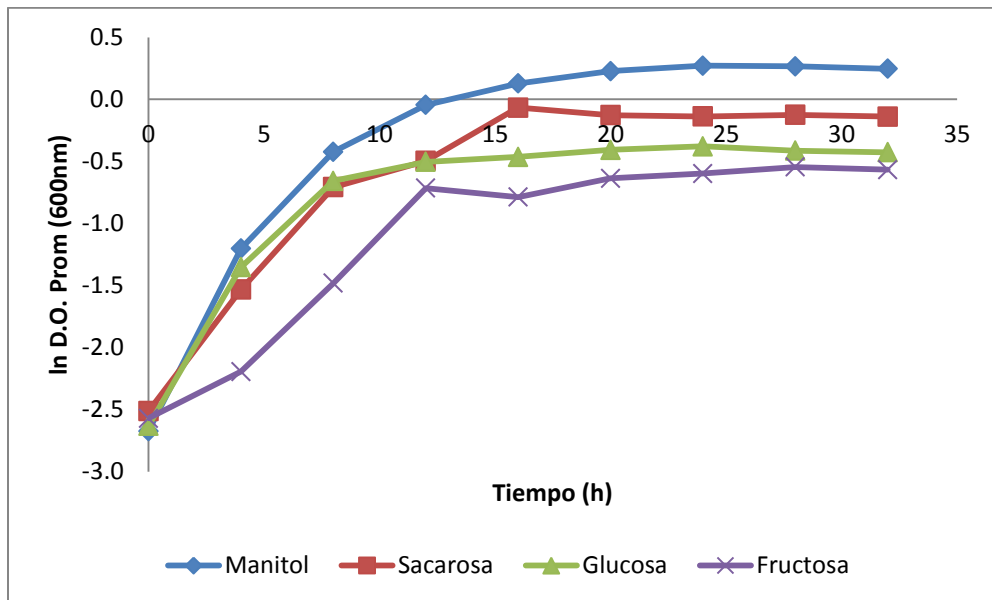


**Figura 14.** Comparación cinética de la variación de la fuente de carbono para la cepa C (Banco Nuevo). El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.

**Tabla 8.** Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de *S. meliloti* C variando la fuente de carbono (banco nuevo).

Fuente de Carbono	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	UFC/mL	Productividad (UFC*mL/h)
Manitol	0.13	$1.4 \times 10^9$	$5.0 \times 10^7$
Sacarosa	0.08	$8.2 \times 10^8$	$2.9 \times 10^7$
Glucosa	0.06	$6.3 \times 10^6$	$2.2 \times 10^5$
Fructosa	0.08	$1.8 \times 10^7$	$6.4 \times 10^5$





**Figura 15.** Comparación cinética de la variación de la fuente de carbono para la cepa D (Banco Nuevo). El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.

**Tabla 9.** Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de *S. meliloti* D variando la fuente de carbono (banco nuevo)

Fuente de Carbono	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	UFC/mL	Productividad (UFC*mL/h)
Manitol	0.14	$7.0 \times 10^9$	$2.5 \times 10^8$
Sacarosa	0.12	$4.4 \times 10^8$	$1.5 \times 10^7$
Glucosa	0.10	$5.5 \times 10^6$	$1.9 \times 10^5$
Fructosa	0.14	$8.3 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$

## 5.6 Variación relación C/N cepas C y D (Banco Nuevo)

Los carbohidratos son de las principales biomoléculas estructurales en todos los organismos vivos. Se sabe que en las células bacterianas, hay 3 mecanismos dependientes de energía para la toma de azúcares; el primero que es muy utilizado opera mediante el simporte de protones y se utiliza para la toma de azúcares como galactosa, xilosa y lactosa. (Henderson et al, 1992). Un segundo sistema, el fosfoenolpiruvato: fosfotransferasa (PTS), es encontrado en muchas bacterias y es el encargado del transporte de glucosa, fructosa, sacarosa, manosa y algunos polioles como el manitol en muchas Gram negativas como en *E. coli*; y por la similitud metabólica que comparte *S. meliloti* con *E. coli*, es muy probable que este sistema este presente en *Sinorhizobium* (Saier et al, 1994). Y por último, el tipo transportador periplásmico ABC (binding protein-dependent ATP-binding cassette), que es capaz de transportar un amplio rango de carbohidratos como monosacáridos (como la arabinosa o ribosa), disacáridos como maltosa y oligosacáridos (Saier y Reizer., 2000).

Es entonces común pensar que como organismo libre utilice una amplia variedad de azúcares como únicas fuentes de carbono, incluyendo los azúcares en los cuales se basaron los ensayos, como sacarosa, glucosa y fructosa; que justamente son de los principales metabolitos que son transportados a los nódulos de la raíz para la alimentación de los bacteroides (Fougère et al, 1991).

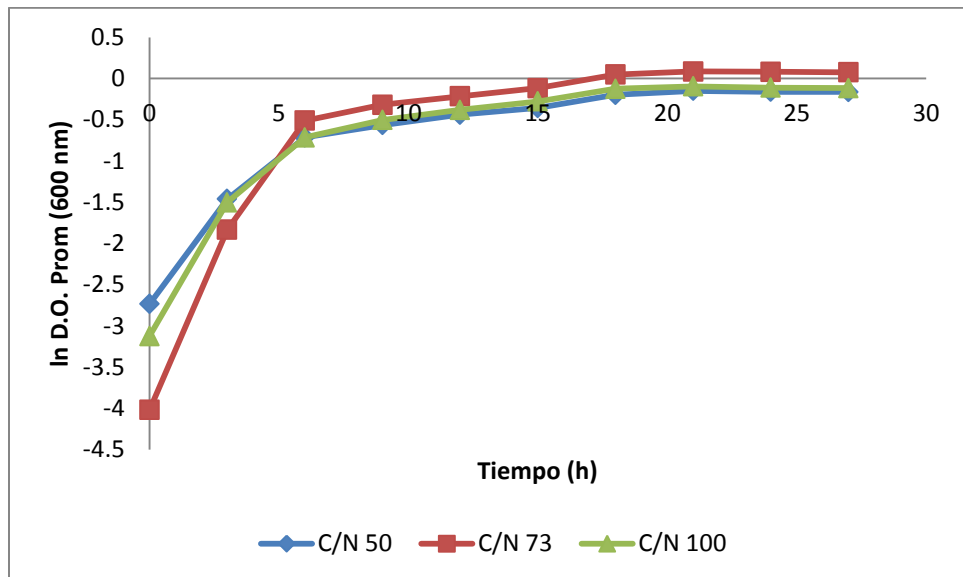
### 5.6.1 Manitol

Se logró demostrar que *S. meliloti* crece con una amplia variedad de azúcares, sin embargo se observó preferencia por el manitol. Hasta el momento no hay una respuesta precisa para explicar el hecho del por qué varios tipos de rizobios crecen bastante bien con este sustrato. Sin embargo, se han hecho estudios del transporte y metabolismo del manitol. Cabe destacar también que este azúcar es usado principalmente como fuente de carbono primordial o única para las formulaciones de los medio de cultivos de este tipo de bacterias fijadoras de nitrógeno.

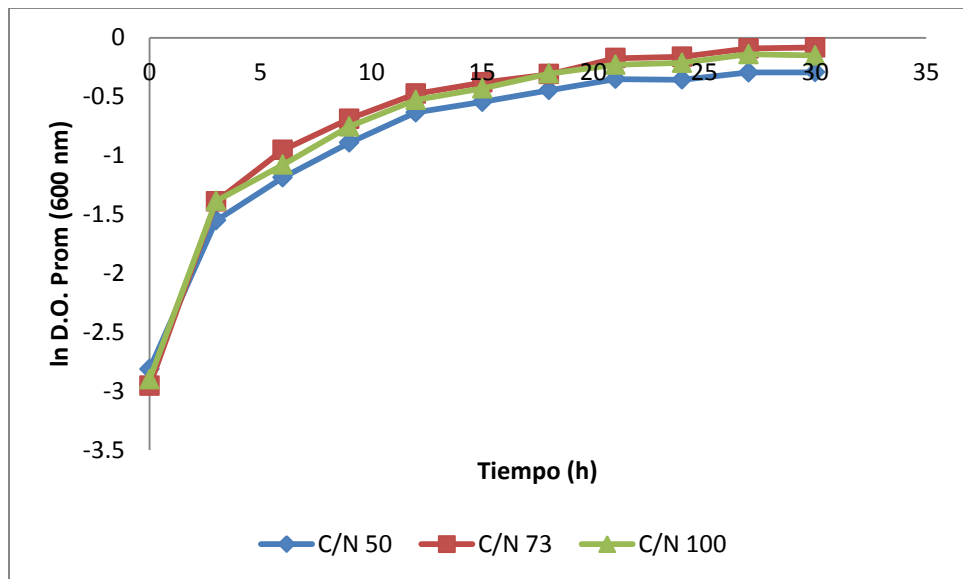
Se ha demostrado que los polioles, como el manitol, son sustratos para una deshidrogenasa inducible que convierte manitol en fructosa o xilulosa, y así se favorece la toma y el transporte (Arias et al, 1982); cabe destacar que *S. meliloti* es incapaz de consumir la fructosa como única fuente de carbono. Por ejemplo, en los trabajos de Kuykendall y Elkan (1976), evalúan la presencia de este tipo de enzimas en *R. japonicum*, encontrando que existe una correlación directa entre la aparición de una NAD dependiente D-manitol deshidrogenasa y su capacidad para metabolizar este sustrato; cuya concentración de enzima incrementa hasta siete veces mediante la presencia de manitol en el medio de cultivo. También se reporta que la actividad específica de la deshidrogenasa va aumentando con respecto al tiempo, encontrándose 4 veces la concentración después de 5 horas con respecto a la inicial, y esto explica muy bien y puede ser extrapolado al hecho entonces del comportamiento cinético superior y las densidades ópticas más elevadas de las distintas cepas cuando crecieron con manitol a comparación de otras fuentes de carbono suministradas.

Ahora bien, este mismo modelo puede proponerse para *S. meliloti* y puede ser más rápido y específico tratándose de una bacteria fijadora de nitrógeno de rápido crecimiento, y esto también se demuestra en el artículo de Kuykendall y Elkan, en donde la actividad de la deshidrogenasa es 2 o 3 veces mayor en *R. meliloti* a comparación de *R. japonicum*, además de que en ambos microorganismos aparentemente el manitol es directamente oxidado como un hexitol libre, en vez de una vía de intermediario fosforilado; esto por el hecho de que se analizaron extractos celulares y se halló actividad de la deshidrogenasa con manitol, pero no así con D-manitol I-fosfato.

En la figura 16 se muestra el crecimiento de la cepa C con manitol, variando la relación C/N y en la figura 17 se muestra el crecimiento de la cepa D también con manitol bajo la misma variación de la relación C/N.



**Figura 16.** Variación de la relación C/N con manitol como fuente de carbono para la cepa C. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.



**Figura 17.** Variación de la relación C/N con manitol como fuente de carbono para la cepa D. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.

### 5.6.2 Sacarosa

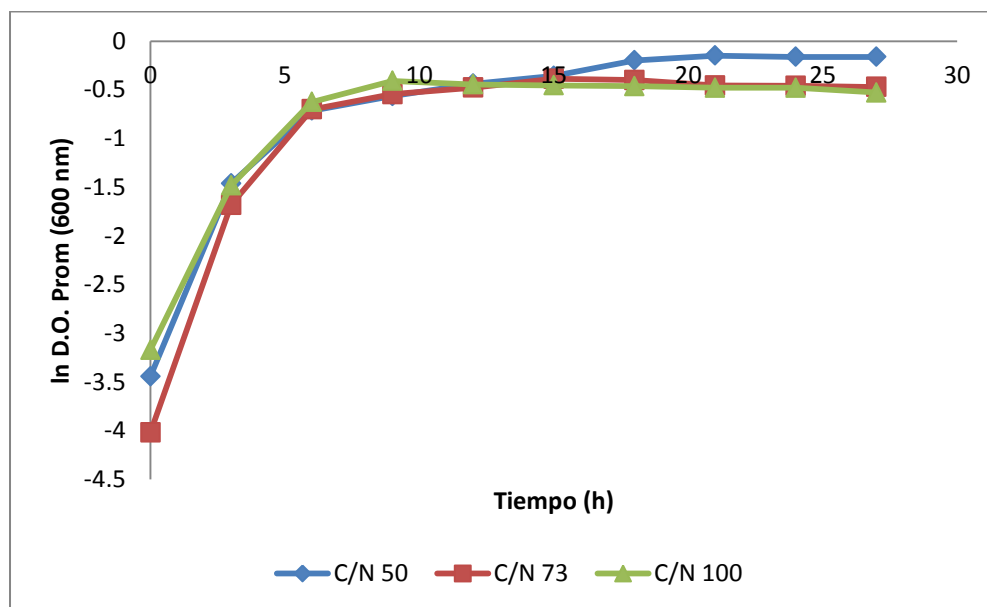
En el caso de la sacarosa, se sabe que es producto de la fotosíntesis de las plantas y que es la principal fuente de carbono en los nódulos de las raíces de las leguminosas. Este es metabolizado mediante la acción de enzimas como la sacarosa sintasa y de la vía glicolítica, principalmente en el citoplasma de la planta de la zona infectada del nódulo (Willis and Walker, 1999). Muchos compuestos carbonados son abundantes en los nódulos de las leguminosas, y es posible que más de una fuente de carbono se proporcione apoyando así a la fijación de nitrógeno. Lo que también es probable es que la naturaleza de estos compuestos cambie con el desarrollo del nódulo y pueden variar entre las especies de leguminosas. Sin embargo, es generalmente aceptado que los C4-dicarboxilatos son los principales productos de la degradación de la sacarosa suministrada a bacteroides para apoyar la fijación de nitrógeno en la mayoría de las legumbres. Esta evidencia proviene de estudios con las plantas y los bacteroides (Udvardi y Day, 1997).

En base a esta observación, se puede pensar que es posible que sea necesario el transporte e hidrólisis de la sacarosa, o bien inducido durante la simbiosis. Sin embargo, la probable importancia del metabolismo de este azúcar no ha sido evaluado con certeza aún. No hay evidencia de la presencia de actividad de fosforilasa para la sacarosa, requerida para el transporte de la sacarosa vía fosfoenolpiruvato fosfotransferasa, en *Rhizobium* de rápido o lento crecimiento (Willis and Walker, 1999)

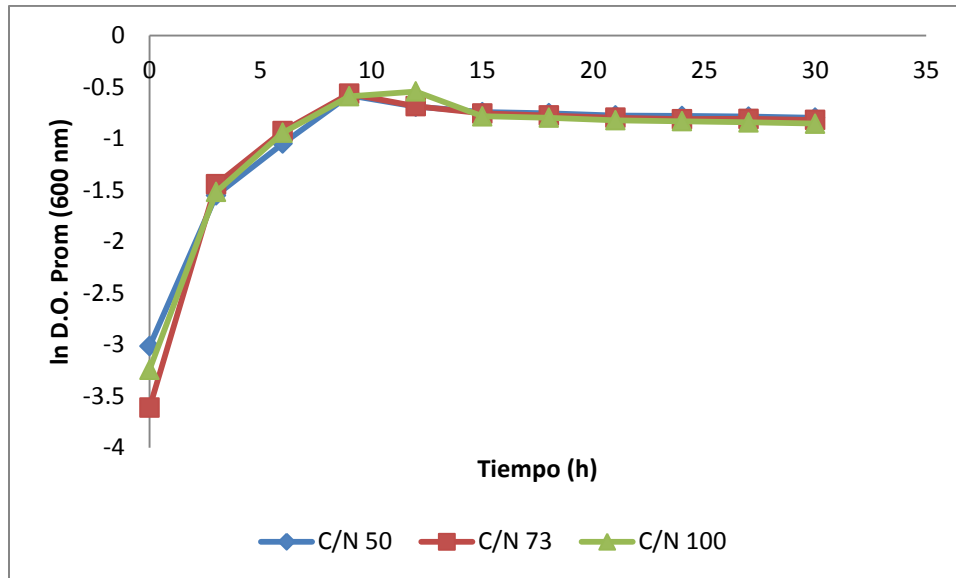
Diversos estudios del metabolismo de disacáridos han demostrado que el transporte e hidrólisis de la sacarosa son inducibles en *S. meliloti*. Los resultados de algunos estudios sugieren que *S. meliloti* posee al menos 3 sistemas de toma y transporte para los disacáridos.

El primero que transporta sacarosa, maltosa y trehalosa; el segundo el cual se encarga del transporte de la lactosa; y un tercero que transporta celobiosa (Glenn y Dilworth, 1981). El transporte de sacarosa en el hilo de infección no ha sido investigado, sin embargo, es muy probable también que sea el sistema PTS el cual predomine para el transporte de la sacarosa, ya que ésta es uno de sus principales sustratos.

En la figura 18 se muestra el crecimiento de la cepa C con sacarosa, variando la relación C/N y en la figura 19 se muestra el crecimiento de la cepa D también con sacarosa bajo la misma variación de la relación C/N.



**Figura 18.** Variación de la relación C/N con sacarosa como fuente de carbono para la cepa C. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.



**Figura 19.** Variación de la relación C/N con sacarosa como fuente de carbono para la cepa D. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.

### 5.6.3 Glucosa

Como rizobio de rápido crecimiento con un tiempo de generación o duplicación de menos de 6 horas en un medio complejo, *S. meliloti* es capaz de convertir la glucosa en gluconato, de una manera relativamente eficiente y que posteriormente entra en el metabolismo (ver figura 13) (Fuhrer et al, 2005). Pero de acuerdo a los resultados obtenidos observamos que el crecimiento de *S. meliloti* fue muy poco en todas las relaciones C/N ya que alcanzó densidades ópticas muy bajas, esto en medio de cultivo definido lo que pueda estar ocasionando estos bajos rendimientos.

De acuerdo a Fuhrer et al, (2005) en *S. meliloti*, se supone que la piruvato carboxilasa es la reacción anaplerótica por analogía a *A. tumefaciens*. Ambas vías, pentosas y Entner-Doudoroff fueron reportadas como presentes, y la glucólisis se informó a estar ausente en ambos rizobios.

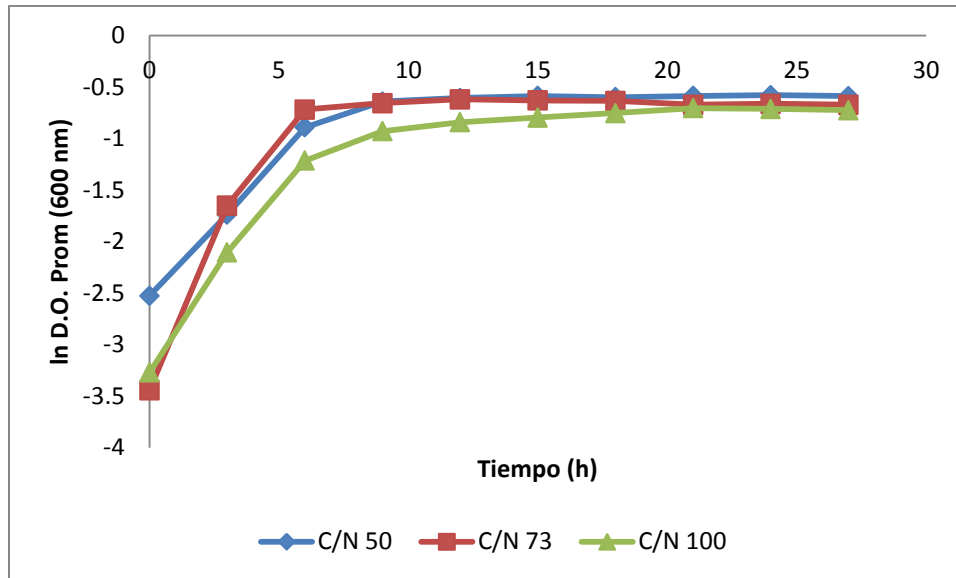
En los dos microorganismos, la vía de Entner-Doudoroff es básicamente la vía exclusiva de la degradación de la glucosa, mientras que los precursores de pentosa-5-P para la biomasa se generan a través de la oxidación y el metabolismo no oxidativo de las ramas de la vía de las pentosas.

Estos datos también se correlacionan con los trabajos de Udvardi y Day (1997), en donde está reportado que la vía de Entner-Doudoroff es la principal vía para el catabolismo de la glucosa de los rizobios; aunque las rutas de Embden-Meyerhof y pentosa fosfato también operan en *Rhizobium sp.* Sin embargo, los bacteroides no pueden utilizar mono o disacáridos con eficacia. Esto es de gran relevancia, ya que por ejemplo los bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum*, aislados de nódulos de las raíces de soya, no pueden transportar la glucosa y parecen carecer de una vía glucolítica completa. Por otro lado, los bacteroides de *Rhizobium leguminosarum* no pueden transportar ni metabolizar hexosas y disacáridos. Además, muchas de las enzimas necesarias inducibles para el metabolismo carbonado de la cepas de crecimiento rápido de *Rhizobium sp.* están ausentes en los bacteroides aislados de nódulos de frijol, lo que sugiere que la planta no proporciona estos azúcares a los bacteroides. (Udvardi y Day, 1997).

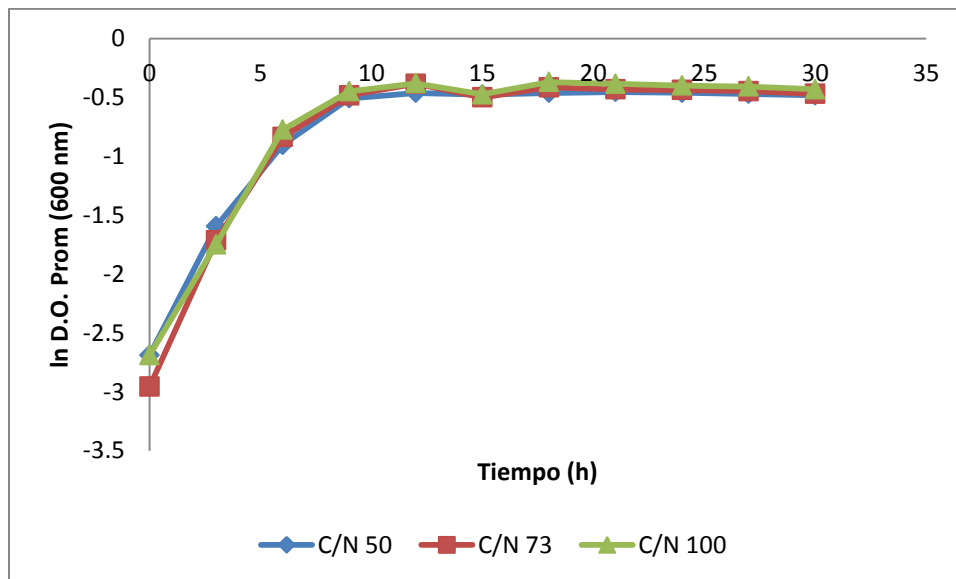
Lo mismo se puede pensar en el caso del crecimiento de *S. meliloti* con la glucosa y fructosa; que éstos azúcares de la planta no son esenciales para el metabolismo bacteroide de *S. meliloti* y la fijación simbiótica de nitrógeno. Esto se puede demostrar también en el trabajo de Udvardi y Day (1997), por el hecho de que los mutantes de *Rhizobium* afectados en el consumo de azúcar o el metabolismo siguen conservando la capacidad de reducir el nitrógeno durante la simbiosis.

En la figura 20 se muestra el crecimiento de la cepa C con glucosa, variando la relación C/N y en la figura 21 se muestra el crecimiento de la cepa D también con glucosa bajo la misma variación de la relación C/N.





**Figura 20.** Variación de la relación C/N con glucosa como fuente de carbono para la cepa C. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.



**Figura 21.** Variación de la relación C/N con glucosa como fuente de carbono para la cepa D. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05.

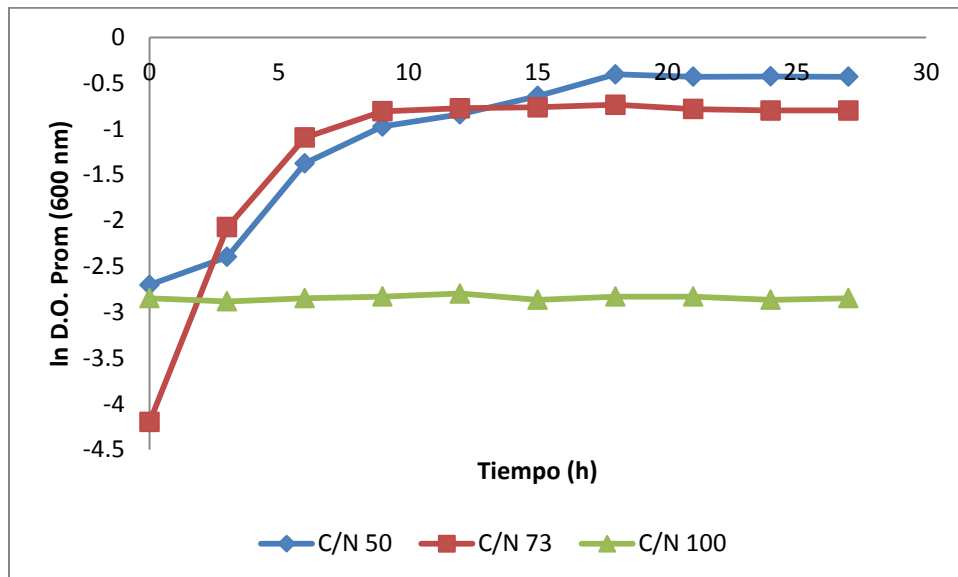
#### 5.6.4 Fructosa

En el caso de la fructosa, muchas bacterias gram negativas transportan a esta molécula mediante un sistema específico PTS con la producción de fructosa-1-fosfato, y se presentan varias características que no son encontrados en otros sistemas PTS para otro tipo de azúcares. Principalmente posee su propio fosfato-transportador (FPr), mientras que los otros sistemas utilizan el transportador HPr para transferir el fosfato entre la enzima I y la enzima II específica para el azúcar. En contraste, en los géneros de *Rhizobium spp.* la toma de fructosa no parece ser dependiente de un sistema PTS, ya que el azúcar no es fosforilado durante el transporte (Lambert et al, 2001).

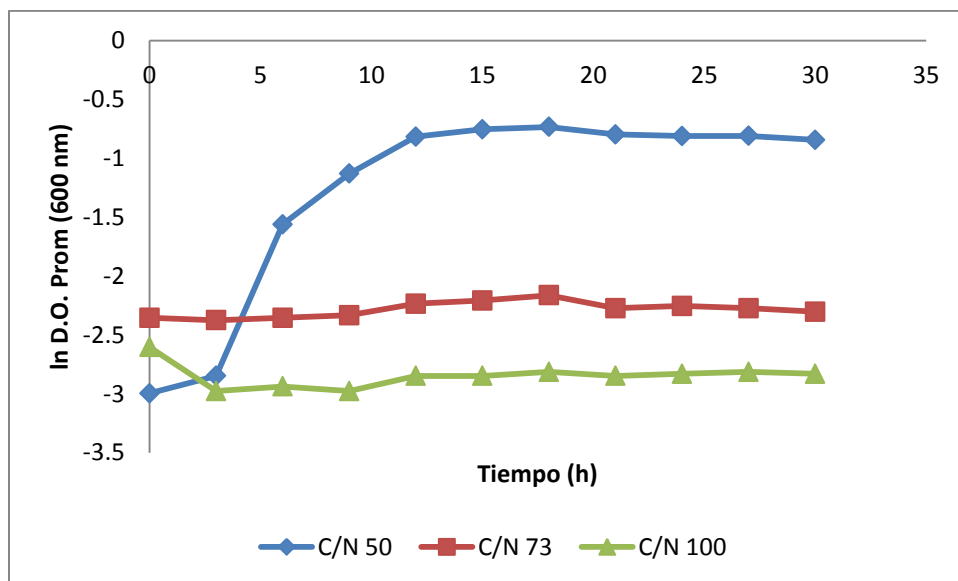
Además, se tiene registrado que bacterias de éste género como *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* probablemente carecen de enzimas como la fructocinasa o la fosfoglucosa isomerasa, por lo cuales son incapaces de crecer en un medio con fructosa como única fuente de carbono; esto indicaría que este azúcar es acumulado en un forma no fosforilada (El Guezzar et al, 1988).

De otra forma, el catabolismo de fructosa ocurriría mediante la fosforilación de esta molécula en fructosa-6-fosfato y convertida posteriormente en glucosa-6-fosfato para después ser metabolizada por la vía de Entner Doudoroff. Tal es el caso de los resultados obtenidos variando fuentes de carbono, ya que con fructosa no se obtuvo crecimiento.

En la figura 22 se muestra el crecimiento de la cepa C con fructosa, variando la relación C/N y en la figura 23 se muestra el crecimiento de la cepa D también con fructosa bajo la misma variación de la relación C/N.



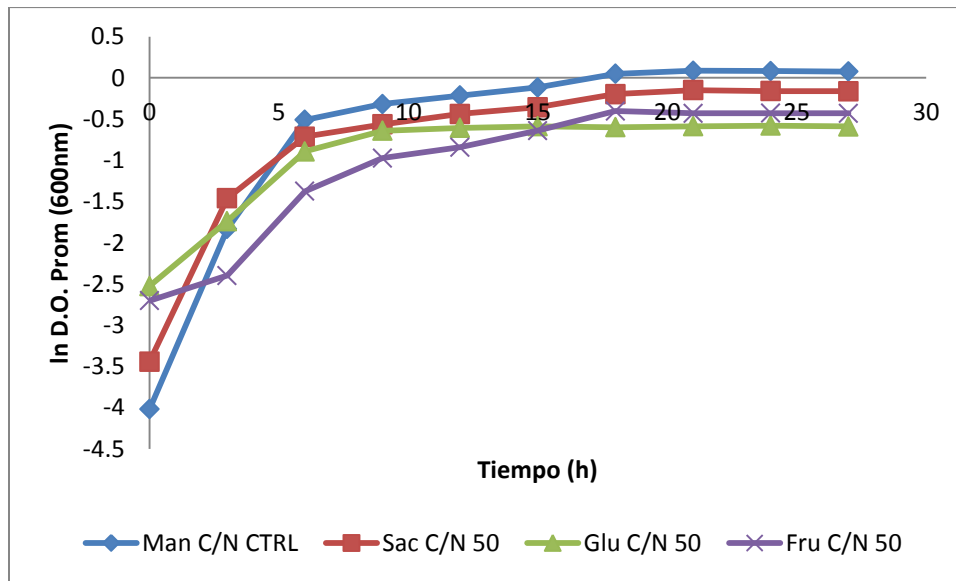
**Figura 22.** Variación de la relación C/N con fructosa como fuente de carbono para la cepa C. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05



**Figura 23.** Variación de la relación C/N con fructosa como fuente de carbono para la cepa D. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05

## 5.7 Comparación de las condiciones de mayor crecimiento para las cepas C y D

En la figura 24 se presenta una comparación de las relaciones C/N con las cuales la cepa C tuvo un crecimiento más eficiente y en la tabla 10 la comparación de la velocidad específica de crecimiento y su viabilidad.

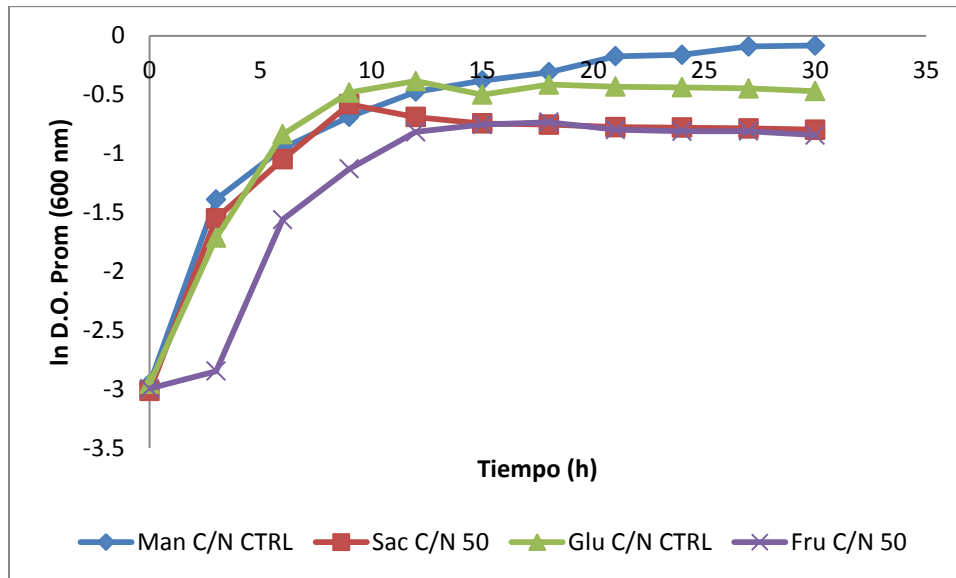


**Figura 24.** Comparación de las mejores relaciones C/N con respecto a las fuentes de carbono utilizadas para la cepa C. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05

**Tabla 10.** Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de las relaciones C/N más eficientes para la cepa C.

Fte y C/N	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	UFC / mL	Productividad (UFC*mL/h)
Manitol C/N73	0.25	1 X 10 <sup>9</sup>	3.5X10 <sup>7</sup>
Sacarosa C/N 50	0.15	6.5 X 10 <sup>8</sup>	2.3X10 <sup>7</sup>
Glucosa C/N 50	0.18	2 X 10 <sup>7</sup>	7.1X10 <sup>5</sup>
Fructosa C/N 50	0.13	7 X 10 <sup>7</sup>	2.5X10 <sup>6</sup>

En la figura 25 se presenta una comparación de las relaciones C/N con las cuales la cepa D tuvo un crecimiento más eficiente y en la tabla 11 la comparación de la velocidad específica de crecimiento y su viabilidad.



**Figura 25.** Comparación de las mejores relaciones C/N con respecto a las fuentes de carbono utilizadas para la cepa D. El ensayo se realizó por duplicado a 30°C y 200 rpm. En todos los casos la desviación estándar fue menor a +/- 0.05

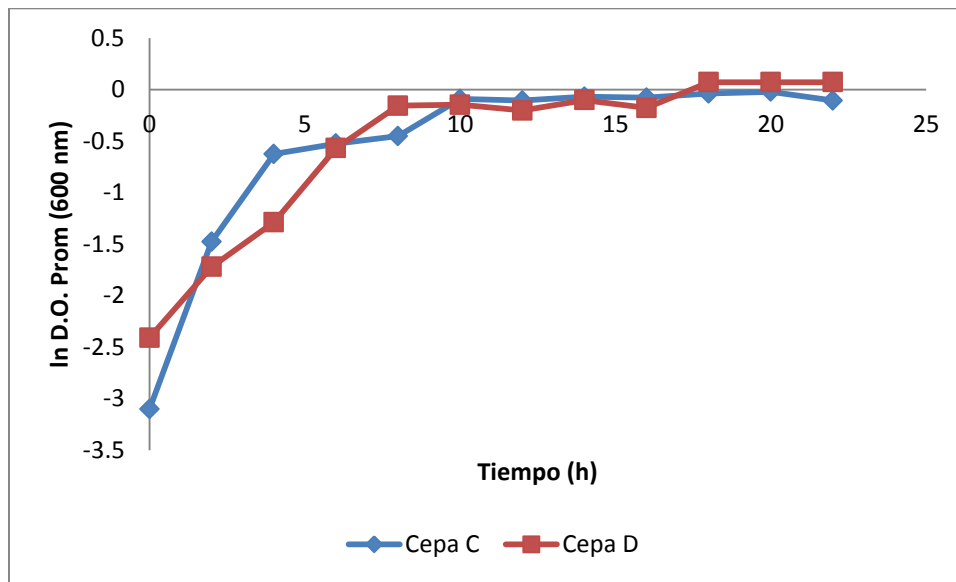
**Tabla 11.** Comparación velocidad específica de crecimiento y viabilidad de las relaciones C/N más eficientes para la cepa D

Fte y C/N	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	UFC / mL	Productividad (UFC*mL/h)
Manitol C/N 73	0.12	2 X 10 <sup>9</sup>	7.1X10 <sup>7</sup>
Sacarosa C/N 50	0.16	4 X 10 <sup>8</sup>	1.4X10 <sup>7</sup>
Glucosa C/N 73	0.18	2 X 10 <sup>7</sup>	7.1X10 <sup>5</sup>
Fructosa C/N 50	0.21	6 X 10 <sup>7</sup>	2.1X10 <sup>6</sup>

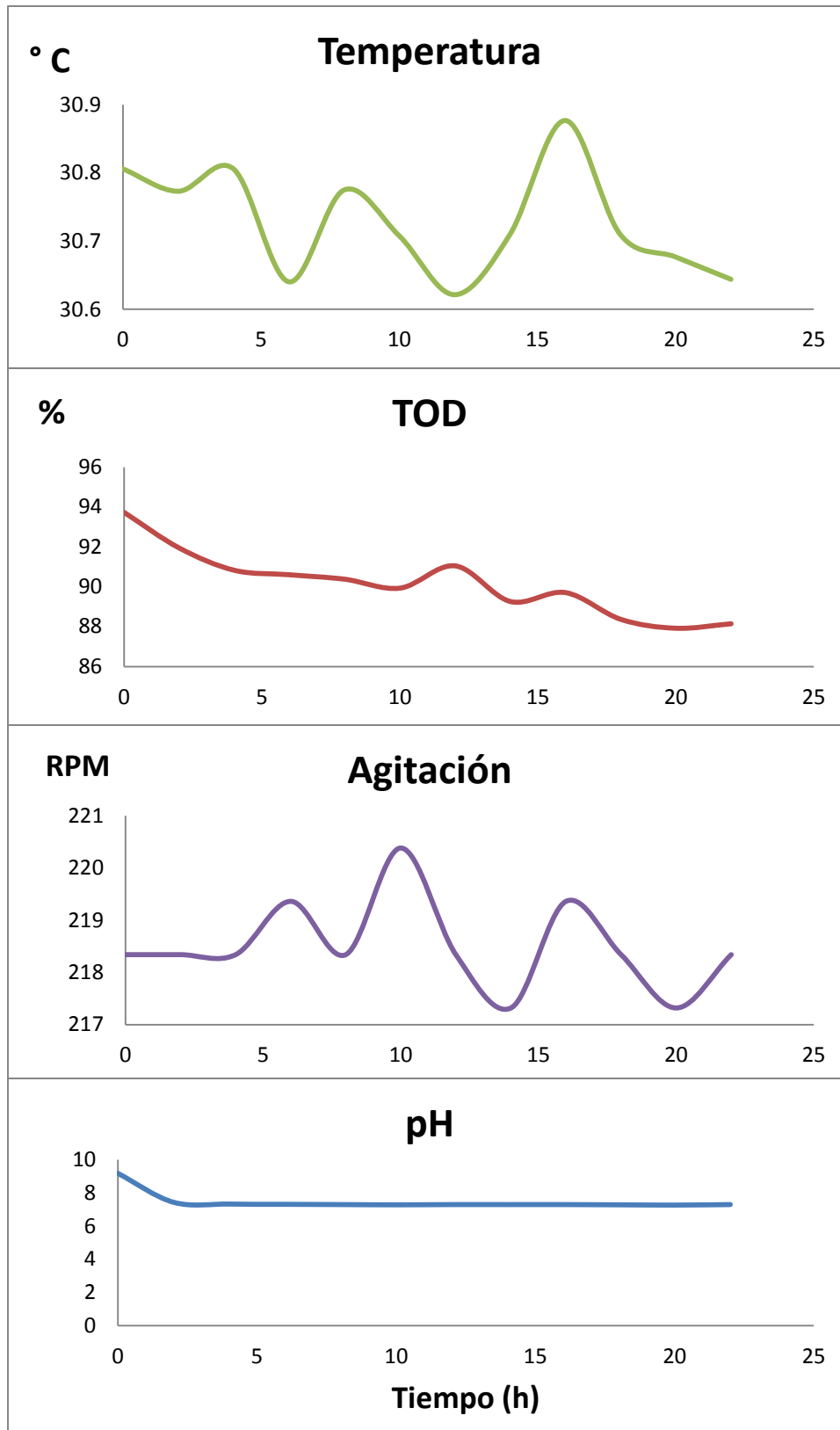
En cuanto a esta parte se refiere, como conclusión podemos decir que tanto para las cepas C y D la fuente de carbono control (manitol), así como la concentración estándar (C/N 73) resultaron ser las condiciones óptimas de crecimiento de éstas cepas de acuerdo a los valores obtenidos de viabilidad y productividad.

### 5.8 Cultivo *S.meliloti* C y D en biorreactor de 12 L.

Se seleccionaron las condiciones de operación del fermentador de acuerdo a los datos registrados en el trabajo de Hernández y Santillán (1993) En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos del crecimiento de *S. meliloti* en biorreactor de 12 L; por otro lado los registros de los parámetros físicos y químicos obtenidos del controlador del biorreactor se muestran en la figura 27.



**Figura 26.** Cinética de crecimiento de *S. meliloti* C y D en reactor de 12 L. El ensayo se realizó a 30°C, 200 rpm, 1vvm y pH inicial de 7.0



**Figura 27** Parámetros físicoquímicos obtenidos del controlador durante el cultivo en biorreactor de *S. meliloti* C y D.

La velocidad específica de crecimiento para la cepa C es de  $0.15 \text{ h}^{-1}$  mientras que para la cepa D es de  $0.19 \text{ h}^{-1}$ . En cuanto al recuento de colonias se refiere la cepa C presentó  $1.7 \times 10^9$  UFC/mL y la cepa D  $2.2 \times 10^9$  UFC/mL.

Al comparar estos resultados del biorreactor frente los de los matraces en las mejores condiciones, observamos una similitud entre ambos ensayos tanto en la densidad óptica registrada y en la viabilidad, pero no así en la velocidad específica de crecimiento.

Por ejemplo, en cuanto a la densidad óptica se refiere, observamos que los valores de la cepa C y D cultivados en biorreactor se encuentran muy cercanos a 1.0, mientras que los valores obtenidos en los matraces bajo las mejores condiciones también observamos una densidad óptica en un intervalo de 9.0-1.0. Esto era de esperarse, considerando que la fuente de carbono utilizada en ambos era la misma, es decir manitol.

Por otro lado, la velocidad específica de crecimiento de la cepa C en biorreactor es de  $0.15 \text{ h}^{-1}$ , mientras que en el ensayo bajo las mejores condiciones es de  $0.25 \text{ h}^{-1}$ . Para la cepa D en biorreactor corresponde a  $0.19 \text{ h}^{-1}$  y el valor bajo las mejores condiciones corresponde a  $0.12 \text{ h}^{-1}$ . Observamos en este sentido un poco de discrepancia ya que siendo cultivos de diferente naturaleza, (biorreactor y matraz) el comportamiento y crecimiento de la bacteria es diferente; esperando que fuera mejor u óptimo el crecimiento en biorreactor ya que es un sistema más controlado y con una mecánica de funcionamiento distinta a comparación de un matraz convencional. Por otro lado cabe destacar que los microorganismos inoculados provienen de un banco almacenado a una temperatura de  $-70^\circ \text{ C}$  lo que pudo haber dañado la viabilidad y la estructura celular, ocasionando dichos cambios en el comportamiento cinético dentro del matraz como del biorreactor.

Finalmente, la viabilidad reportada en todos los casos para ambos ensayos, es muy similar siendo del orden de  $10^9$ , con una productividad de  $8.5 \times 10^7$  UFC/mL\*h para la cepa C, y de  $1.1 \times 10^8$  UFC/mL\*h para la cepa D; lo que nos habla de una buena productividad después de la producción y del valor máximo comparado con otros ensayos a nivel matraz.



## 5.9 Posible determinación de PHB (polihidroxi-butirato)

Aunque en el presente trabajo no se enfocó en la producción y cuantificación de este polímero, pensamos que es también de gran relevancia el estudio de la relación que existe entre la síntesis de éste y la supervivencia de la bacteria.

Como ahora se sabe con certeza, existe transferencia de nutrientes en la simbiosis planta-bacteria, entre ellos distintas fuentes de carbono. Las bacterias simbióticas pueden guardar o “secuestrar” cierta cantidad de éstos compuestos carbonados y almacenarlos en forma de polímeros como el poli-3-hidroxi-butirato (PHB); y en algunas ocasiones el porcentaje de acumulación excede el 50% en peso seco de las células de los *Rhizobium* (Bergersen y Turner, 1991).

Han sido propuestas diversas ideas en las que este tipo de bacterias podrían utilizar este polímero, entre ellas se incluyen la respiración para proteger a la nitrogenasa de la desactivación por oxígeno y como alimentación para crear bacteroides más grandes y eficientes para la fijación del nitrógeno.

Alternativamente, se propone que el PHB puede ser requerido como método de supervivencia de las mismas células, así como casos de estrés como por ejemplo en una etapa de senescencia en donde el alimento escasea, cuando ocurren cambios de temperatura y osmóticos o cuando se rompe esa unión de simbiosis y regresan al suelo (Tavernier et al, 1997.)

Ahora bien, la interrogante u objeto de estudio en un futuro sería en qué momento o etapa de crecimiento es que este polímero es formado y cómo sería la relación de consumo de PHB y el grado de supervivencia bacteriana. Si bien no se sabe con toda certeza como ocurre todo estos fenómenos en las rizobacterias, se han hecho estudios para algunas de ellas, incluyendo *S. meliloti*.

Por ejemplo, en los trabajos de Ratcliff et al (2008), se estudió la relación cuantitativa del consumo del PHB con respecto al porcentaje de supervivencia de *S. meliloti*, encontrando como resultado que efectivamente el PHB fue utilizado para mantener la viabilidad celular ya que se incrementó la reproducción antes de entrar a la fase estacionaria. Esto sugiere lo que ya habíamos mencionado, que existe una relación muy estrecha entre el catabolismo del PHB y la reproducción y mantenimiento de la viabilidad en etapas de estrés, ya sea por falta de alimentos o por factores físicos.

Por otro lado, también se discute que bioquímicamente, la acumulación de PHB disminuye de cierta manera la capacidad de fijación de nitrógeno por parte de la bacteria durante la simbiosis, aspecto que es de gran preocupación ya que la finalidad es que se fije la mayor cantidad de nitrógeno para un buen rendimiento en la planta. Todas estas cuestiones y preguntas tendrían que ser tratadas en los próximos ensayos en lo que respecta a la viabilidad de estas bacterias fijadoras de nitrógeno.

## 6. CONCLUSIONES

- El Banco Maestro (BM) y Banco de Trabajo (BT) conservados en crioviales a  $-70^{\circ}$  C y con glicerol al 50% fue un método adecuado para la preservación de *S. meliloti* en un periodo corto (6 a 7 meses) con respecto a la conservación en caja; la viabilidad y crecimiento no se vieron afectados significativamente, por lo que se recomienda seguir utilizando los bancos en futuros ensayos así como este tipo de conservación para las rizobacterias.
- El medio con manitol (original o control) a una C/N 73, proporcionado por la empresa, resultó ser el óptimo para la producción y crecimiento de inoculante, ya que en promedio se alcanzó la mayor cantidad de biomasa cuantificada y se registraron valores de viabilidad del orden de  $10^9$  UFC/mL, con una productividad de  $7.1 \times 10^7$  UFC/mL\*h
- La glucosa y fructosa demostraron ser fuentes ineficientes para la replicación de la bacteria, al menos como únicas fuentes de carbono; esto probablemente se deba a las rutas metabólicas tomadas por el microorganismo (Entner Doudoroff) o a la incapacidad de tomar y consumir dichas fuentes de carbono.
- Se puede utilizar como alternativa de fuente de carbono otros azúcares y polioles como lo son la sacarosa y arabinosa, sorbitol y xilitol, así como factores de crecimiento para aumentar y optimizar los rendimientos de biomasa.

- Se llevaron a cabo exitosamente los cultivos en los biorreactores de 12 L gracias a la regulación de parámetros como temperatura, pH y oxígeno disuelto y se encontró que la biomasa obtenida fue muy similar a la de los cultivos en matraces.

## **7. Perspectivas**

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta Tesis de Licenciatura, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones.

En un primer plano estarían los trabajos destinados a complementar los aspectos de optimización del medio de cultivo. En concreto, se podría estudiar la modificación de la composición química mediante la utilización de más fuentes de carbono así como de nitrógeno. También se podría evaluar el crecimiento microbiano mediante la adición de sales y otros cofactores importantes para la nutrición de este tipo de bacterias. Otro punto que sería interesante complementar, sería la modificación de factores físicos, como la temperatura de crecimiento, la agitación y el pH por destacar algunos.

En un segundo plano, sería muy importante evaluar a fondo el papel que juega el polihidroxibutirato (PHB) y su relación con el crecimiento y supervivencia de la bacteria ya que es de vital importancia entender este fenómeno para poder eficientar la producción de estos cultivos.

Finalmente, tras superar los obstáculos anteriores, sería de interés realizar más cultivos a nivel biorreactor para posteriormente probar los biofertilizantes en el campo y comprobar sus efectos benéficos a favor de la agricultura.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Arias, A; A. Gardiol y G. Martinez-Drets, (1982). Transport and Catabolism of D-mannose in *Rhizobium meliloti*, *Journal of Bacteriology*. 151 (3): 1069-1072.

Becker, M., Ladha, J.K., Ali, M. (1995). Green manure technology: potential usage and limitations. A case study for low and rice. *Plant and Soil*. 174: 181-194.

Bergersen F., Peoples, M. y Turner G. (1991). A role for poly-bhydroxybutyrate in bacteroids of soybean nodules. *Proceedings of the Royal Society London B* 245: 59–64.

Bohlool, B.B., Ladha, J.K., Garrity, D.P., George, T. (1992). Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective. *Plant and Soil*. 141: 1-11.

Brenner, D.J., Garrity, G.M., Krieg, N.R., Staley, J.T. (2005). proteobacteria: The alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria. *Springer Science*. pp. 326–327

Burris, R. (1991). Nitrogenases. *Journal of Biological Chemistry*. 266 (15): 9339-9342.

Cook, B., Pengelly, B., Brown, S., Donnelly, J., Eagles, D., Franco, A., Hanson, J., Mullen, B., Partridge, I., Peters, M., Schultze, R. (2005). *Tropical Forages: an interactive selection tool.*, [CD-ROM], CSIRO, DPI y F (Qld). CIAT y FLRF, Brisbane, Australia.

Deppler, H. y Perlman, D. *Microbial Technology*. Academic Press. 2° Edición (1979).

Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T. (2001). *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y Fronteras*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

El Guezzar, M., Hornez, J., Courtois, B. y Derieux, J. (1988). Study of a fructose-negative mutant of *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiology Letters*. 49:429–434.

Entner, N., and Doudoroff, M. (1952) Glucose and Gluconic Acid Oxidation of *Pseudomonas saccharophila* Journal of Biological Chemistry. 196, 853 – 862

Ferry, P., H. Blachere, y M. Obaton. (1959). Un milieu de culture synthétique pour *Rhizobium meliloti*. Ann. Agron. 10:219-233.

Fougère, F., Le Rudulier, D. y Streeter, J. (1991). Effects of salts stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa ("*Medicago sativa L.*"). Plant Physiology. 96:1228–1236

Franco, A. y Dobereiner, J. (1994). A biología do solo e sustentabilidade dos solos tropicais. Summa Phytopathologica. 20:68-74

Freire, J.R. y Sato, M.L. (1999). Conservación de Cultivos de Rizobios. Revista Latinoamericana de Microbiología 41: 35-41. Asociación Latinoamericana de Microbiología.

Frioni, L, (1999). Procesos Microbianos. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. 205 pp.

Gage, D. (2004). Infection and Invasion of Roots of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68(2): 280-300.

García, A.M. y Ponce, E. (2003). Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. Biotecnología Aplicada; 20:85-94.

Glenn, A. R., y Dilworth, M.J., (1981). The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast- and slow-growing species of *Rhizobium*. Archives of Microbiology. 129:233–239.

González, A. (2010). Biofertilizantes: microorganismos benéficos para la agricultura. Investigación y desarrollo (iD). [www.invdes.com.mx/suplemento](http://www.invdes.com.mx/suplemento).

Graham, P.H., (1975): Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants, Nutman (ed), Cambridge Univ. Press.

Graham, P.H., Vance, C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*. 131: 872-877.

Henderson, P., Baldwin, S., Cairns, M., Charalambous, B., Dent, H., Gunn F., Liang, W., Lucas, V., Martin, G., McDonald, T., McKeown, B., Muiry, J., Petero, K., Roberts, P., Shatwell, K., Smith, G., y Tate, C. (1992). Sugar-cation symport systems in bacteria. *International Review Cytology*. 137A:149–208.

Hernández Hernández, Juan y Santillán Ortega, Isabel Mercedes. (1993). Optimización del medio de cultivo de *Rhizobium meliloti* para la obtención de inoculante (biomasa) y para la producción de exopolisacárido (goma). (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México).

Jenkinson, D.A., (2001). The impact of humans on the nitrogen cycle with focus on temperature arable agriculture. *Plant and Soil* 228:3-15.

Jensen, S.E., Hauggaard-Nielsen, H. (2003). How can increased use of biological N<sub>2</sub> fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil* 252: 177-186.

Justic, D., Rabalais, N.N., Turner, R.E., Dortch, Q. (1995). Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: stoichiometric nutrient balance and its consequences. *Estuarine Coastal Shelf Science*. 40: 339-356.

Kuykendall, L. y Elkan, G. (1997). Some Features of Mannitol Metabolism in "*Rhizobiurn japonicum*" *Journal of General Microbiology*. 98, 291-295

Kuykendall, D. (2005). *Bradyrhizobium*. Jordan, 1982, 137. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer. US. pp. 325-340.

Kuykendall, D., Young, J., Martínez, E., Kerr, A., Sawada, H. (2005). *Rhizobium*. Frank 1899,338. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Editorial Springer US. pp. 325-340.

Lambert, A., Østerås, M., Mandon, K., Poggi, M.C. y Le Rudulier, D. (2001). Fructose Uptake in *Sinorhizobium meliloti* Is Mediated by a High-Affinity ATP-Binding Cassette Transport System. *Journal of Bacteriology*. 2001, 183(16):4709.

Leary, J.K., Singleton, P.W., Scowcroft, P.G., Bithalcur, D. (2006). Symbiotic diversity in the cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis Journal* 41: 107-117.

Ledley, T.S., Sundquist, E.T., Schwartz, S.E., Hall, D.K., Fellows, T.P., Killeen, T.L. (1999). Climate change and greenhouse gases vol. 80, n° 39, American Geophysical Union, Washington, D.C., USA.

Lum, M.R., Hirsch, A.M. (2003). Root and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation*. 21:368-382.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2002). Brock. *Biología de los microorganismos*. Décima Edición. Ed. Pearson.

Mahecha, L. (2002). El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Revista Colombiana de Ciencia Pecuaria*. 15(2):226-231.

Marín, V.A., Baldani, V.L., dos Santos, R., Baldani, I.J. (2003). Fijación biológica de nitrógeno; bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. Empresa Brasileña de Pesca y Agropecuaria. 44p. (Comunicado técnico).

Monroy, A y Meza, R. (2002). Evaluación de la estabilidad del método de conservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia.

Newton, W., Fisher, K. (2002). Nitrogen Fixation: A General Overview in Nitrogen Fixation at the Millenium. Elsevier Publications. pp. 1-34.



Plazas, C. (2007). Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras. Trabajo de Grado. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia.

Rabalais, N.N., Wiseman, W.J., Turner, R.E., Justic, D., Gupta, B., Dortch, Q. (1996). Nutrient changes in the Mississippi River and system responses on the adjacent continental shelf. *Estuaries and Coasts* 19: 386-407.

Ratcliff, W., Supriya, V. y Ford K. y D. (2008). *Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia*. *FEMS Microbiology Ecology* 65:391–39.

Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., Tyagi, R. (2007). Agro-industrial waste materials and waste water sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*. 98: 3535-3546.

Saier, M. H., Jr., y Reizer, J (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Molecular Microbiology*. 13:755–764.

Sawyer, C.N. y Mc Carty, P.L. (1978). *Chemistry For Environmental Engineering*. 3 th. edition. Mc. Graw -Hill Book Company. 534 p.

Snell, J.J. y Kirsop, B.E. (1984). Introducción. pp. 1-4. In: Snell, J.J. y Kirsop, B.E. (ed). *Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods*. Academic Press, Inc., London.

Sprent, J.I. (2001). *Nodulation in legumes*. Royal Botanical Gardens, Kew, London.

Sylvia, D., Hartel, P., Fuhrmann, J., Zuberer, D. (2005). *Principles and applications of Soil Microbiology*. Segunda Edición. Editorial Prentice Hall. New Jersey, E.E.U.U. 644p.

- Tavernier, P., Portais J., Saucedo, J., Courtois, J., Courtois, B. y Barbotin, J. (1997) Exopolysaccharide and poly-bhydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 21–26.
- Tejeda, M., Benítez, C., González, J. (2005). Effects of Application of Two Organomineral Fertilizers on Nutrient Leaching Losses and Wheat Crop. *Agronomy Journal*. 97:960-967.
- Tejera, N.A., Campos, R., Sanjuán, J., Lluch, C. (2004). Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 161: 329-338.
- Udvardi, M., y Day, D. (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:493–523
- Vance, C.P., Graham, P.H., (1995). Nitrogen fixation in agriculture: application and perspective, En: *Nitrogen Fixation Fundamentals and Applications*. pp. 77-86. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Vance, C.P., (1998). Legumes Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects. En *The rhizobiaceae* HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykass (Eds). Pp. 509-530 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Vanderleyden, J. y Pieternel, R. (1995). The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiology Reviews*. 59: 124-142.
- Wang, T., Romero, J. (2004). Taxonomía de *Rhizobium*. [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_12/Capitulo\\_12.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/Capitulo_12.pdf).
- Willis, L. y Walker, G. (1999). A Novel Sinorhizobium meliloti Operon Encodes an  $\alpha$ -Glucosidase and a Periplasmic-Binding-Protein-Dependent Transport System for  $\alpha$ -Glucosides. *Journal of Bacteriology*. 181(14):4176.